

**MÁRCIA TORRESAN DELAMAIN**

**CORRELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE  
CÉLULAS CD34+ CIRCULANTES E A COLETA  
POR AFÉRESE DE CPP EM PACIENTES  
ONCO-HEMATOLÓGICOS**

Campinas-SP

2004

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

# **CORRELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE CÉLULAS CD34+ CIRCULANTES E A COLETA POR AFÉRESE DE CPP EM PACIENTES ONCO- HEMATOLÓGICOS**

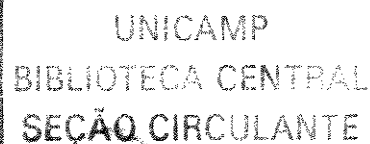
**Aluna: Márcia Torresan Delamain**

**Orientadora: Profa. Dra. Irene Lorand-Metze**

*Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção de título de mestre em Clínica  
Médica, área de concentração Clínica Médica.*

Campinas-SP

2004



UNIDADE PC  
Nº CHAMADA UNICAMP  
D373 C  
V EX  
TOMBO BC/ 64104  
PROC 6.200086.05  
C 8  
PREÇO 11,00  
DATA 20/07/05  
Nº CPD  
Bib. id. 358335

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

D3734 C Delamain, Márcia Torresan  
"Análise da correlação entre a quantidade de células CD34+ circulantes e a coleta por aférese de CPP em pacientes onco-hematológicos" / Márcia Torresan Delamain. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador: Irene Lorand-Metze  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Transplante homólogo. 2. Células primitivas. 3. Hemaférese. 4. Hematologia. 5. Quimioterapia. I. Irene Lorand-Metze. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

## DEDICATÓRIA

---

*Aos meus pais, Léo e Nilza, pela sabedoria em criar seus filhos.*

*Ao meu esposo, José Eduardo, pelo amor e pela dedicação.*

*Às minhas filhas, Catarina e Carolina.*

## AGRADECIMENTOS

---

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Irene Lorand-Metze, responsável direta de toda minha formação em Hematologia. Agradeço pela sua orientação, amizade, paciência neste início da minha trajetória na pesquisa.

Ao Professor Dr. Cármino Antônio de Souza, pelo constante incentivo, conhecimentos transmitidos e pelas oportunidades concedidas atualmente na pesquisa clínica.

Ao Dr. Francisco Comenalli Marques Jr., pela oportunidade de trabalhar em conjunto para desenvolver meu trabalho de investigação. Obrigado pela ajuda em todas as etapas deste projeto, sem exceção.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, pela elaboração, execução da análise estatística e sugestões no meu trabalho.

À Cida, responsável pela realização da imunofenotipagem e das quantificações celulares.

À Mônica e Hélia responsáveis pela realização dos hemogramas.

Aos médicos residentes que participaram diretamente do meu estudo no cuidado dos pacientes internados na enfermaria durante o período de mobilização de CPP.

Aos meus queridos colegas e amigos do Hemocentro com os quais convivo dia a dia o Hemocentro, agradeço pelo apoio.

À Nicete, nossa secretária, pela dedicação e ajuda na rotina do Hemocentro.

À Arlete pela arte final deste trabalho.

Aos pacientes, pela confiança depositada em nosso trabalho diário.

# SUMÁRIO

---

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....                                        | VII       |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                      | VIII      |
| LISTA DE TABELAS .....                                                      | IX        |
| RESUMO .....                                                                | X         |
| ABSTRACT .....                                                              | XII       |
| <b><i>I. INTRODUÇÃO</i></b> .....                                           | <b>14</b> |
| I.1.    CONSIDERAÇÕES GERAIS .....                                          | 15        |
| I.2.    AS CÉLULAS PROGENITORAS HEMOPOIÉTICAS (CPH) .....                   | 16        |
| I.3.    IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CPPH.....                          | 17        |
| I.4.    MOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS PARA O SANGUE PERIFÉRICO ..... | 18        |
| I.4.1.    Biologia do Fenômeno de Mobilização. ....                         | 19        |
| I.4.2.    Estratégias para mobilização de CPPH. ....                        | 23        |
| I.4.2.a.    Quimioterapia mielossupressora isolada. ....                    | 23        |
| I.4.2.b.    Fator de crescimento isolado. ....                              | 24        |
| I.4.2.c.    Quimioterapia associada a fator de crescimento. ....            | 25        |
| I.5.    COLETA DAS CÉLULAS PROGENITORAS PERIFÉRICAS HEMOPOIÉTICAS.....      | 26        |
| I.5.1.    Procedimento de Leucoaférese .....                                | 26        |
| I.5.2.    Quantidade de CPPH para enxertamento .....                        | 26        |
| I.5.3.    Parâmetros para determinar a coleta de CPPH. ....                 | 27        |
| I.5.4.    Fatores que influenciam a coleta de CPPH. ....                    | 28        |
| <b><i>II. OBJETIVOS</i></b> .....                                           | <b>30</b> |
| <b><i>III. CASUÍSTICA E MÉTODOS</i></b> .....                               | <b>32</b> |
| III.1.    PACIENTES .....                                                   | 33        |
| III.2.    AVALIAÇÃO CLÍNICA.....                                            | 33        |

|                  |                                                                                             |           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.3.           | CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA MEGA-QUIMIOTERAPIA .....                                         | 33        |
| III.4.           | REGIME DE MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS PERIFÉRICAS HEMATOLÓGICAS (CPPH) .....        | 34        |
| III.5.           | CUIDADOS DE SUPORTE .....                                                                   | 35        |
| III.6.           | COLETA DE CPPH.....                                                                         | 35        |
| III.6.A.         | INÍCIO DO PROCEDIMENTO .....                                                                | 35        |
| III.6.B.         | EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....                                                                | 36        |
| III.6.C.         | CONTROLE DE QUALIDADE E ARMAZENAMENTO DAS CPP .....                                         | 37        |
| III.7.           | QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD34+ E CONTAGENS CELULARES.....                                  | 37        |
| III.8.           | PARÂMETROS ESTUDADOS .....                                                                  | 38        |
| III.9.           | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                    | 38        |
| <b>IV.</b>       | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                      | <b>40</b> |
| IV.1.            | Características dos Pacientes .....                                                         | 41        |
| IV.2.            | Mobilização e coleta de CPPH .....                                                          | 42        |
| IV.3.            | Evolução da quantidade de células CD34+ no sangue periférico e a otimização da coleta. .... | 45        |
| <b>V.</b>        | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                      | <b>50</b> |
| <b>VI.</b>       | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                       | <b>55</b> |
| <b>VI.</b>       | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                      | <b>57</b> |
| <b>ANEXO I</b>   | <b>.....</b>                                                                                | <b>72</b> |
| <b>ANEXO II</b>  | <b>.....</b>                                                                                | <b>74</b> |
| <b>ANEXO III</b> | <b>.....</b>                                                                                | <b>76</b> |
| <b>ANEXO IV</b>  | <b>.....</b>                                                                                | <b>78</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD34+: antígeno marcador de superfície CD34  
CFU-E: unidade formadora de colônia eritroblástica  
CFU-GM: unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos  
CPH: Célula Progenitora Hemopoiética  
CPP: Célula Progenitora Periférica  
CPPH: Células Progenitoras Periféricas Hemopoiéticas  
c-kit: receptor de fator de stem cell – CD117  
CY: Ciclofosfamida  
CXCR4: receptor para célula estromal derivado do fator 1  
DH: Doença de Hodgkin  
EPO: Eritropoetina  
GEMM: precursor da série granulocítica, eritróide, monocítica e megacariocítica  
G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos  
GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos  
IL-1: Interleucina 1  
IL-8: Interleucina 8  
LNH: Linfoma Não-Hodgkin  
LFA 1: "leucocyte function associated molecule 1"  
LFA 3: " leucocyte function associated molecule 3"  
MM: Mieloma múltiplo  
VP-16: Etoposide  
VLA-4: integrina "very late antigen 4 "  
VLA-5: integrina "very late antigen 5"  
SDF-1: fator 1 derivado da célula estromal  
TNF: fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

---

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Foto demonstrativa da quantificação de CD34+ no sangue periférico por citometria de fluxo. ....        | 18 |
| Figura 2: Modelo do processo da mobilização.....                                                                 | 23 |
| Figura 3: Curva descendente - Regressão polinomial para a pesquisa do dia ideal teórico para coleta de CPPH..... | 47 |
| Figura 4: Curva ascendente - Regressão polinomial para a pesquisa do dia ideal teórico para coleta de CPPH.....  | 48 |
| Figura 5: Curva parabólica - Regressão polinomial para a pesquisa do dia ideal teórico para coleta de CPPH.....  | 48 |

## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Características dos pacientes .....                                         | 42 |
| Tabela 2: Parâmetros do hemograma do sangue periférico antes da Mobilização (D0)..... | 42 |
| Tabela 3: Parâmetros da Mobilização .....                                             | 43 |

## RESUMO

---

As Células Progenitoras Periféricas Hemopoiética (CPPH) são hábeis para restaurar a hemopoiese após tratamento quimioterápico mieloablativo. O tratamento com mega-quimioterapia acompanhado por resgate de CPPH é uma importante abordagem terapêutica utilizada hoje em pacientes com neoplasias hematológicas como Linfoma Não-Hodgkin (LNH), Doença de Hodgkin (LH) e Mieloma Múltiplo (MM).

O regime quimioterápico mais efetivo e de intensidade mais adequada ainda deve ser definido e pode ser claramente demonstrado que a Célula Progenitora Hemopoiética pode ser influenciada por tratamentos prévios. Vários outros parâmetros também podem influenciar na coleta de CPPH após a quimioterapia de mobilização.

A proposta do nosso estudo foi estabelecer parâmetros que possam melhor prever o dia para iniciar a coleta de CPPH com o objetivo de coletar mais células CD34+ com um menor número de procedimentos de leucoaférese.

Nós analisamos, retrospectivamente, pacientes com neoplasias hematológicas tratados em nosso Serviço, que foram submetidos à mobilização para obter CPPH a fim de realizar o transplante autólogo de medula óssea. Os pacientes foram mobilizados com Ciclofosfamida (4 ou 7g/m<sup>2</sup>) e G-CSF na dose de 300µg, sub-cutâneo, diariamente, com o propósito de coletar  $5 \times 10^6$  células CD34+/Kg. Nós investigamos a influência da idade, sexo, diagnóstico, número de linhas quimioterápicas prévias, hemograma do sangue periférico no dia da mobilização, dia quando os neutrófilos  $< 1 \times 10^9/L$  e o dia do nadir (incluindo o intervalo de dias destes dois dias - *delta*). Foi elaborado um modelo matemático utilizando a correlação linear multivariada com o objetivo de prever o melhor dia da coleta. Nós analisamos 134 pacientes: 36 com DH, 65 LNH, 33 MM. A mediana de idade foi de 28, 40 e 48 anos respectivamente. O teste de Pearson mostrou uma correlação para o dia dos leucócitos  $> 1 \times 10^9/L$  com os valores de hemoglobina no dia 0, dia dos neutrófilos  $< 1 \times 10^9/L$ , dia do nadir e doses de quimioterapia de mobilização utilizada. Para cada grupo de doença, um modelo foi desenvolvido:

$$DH: \text{dia da aférese} = \text{delta} \times 1.5 + 6.8$$

LNH: dia da aférese =  $\text{delta} \times 0.88 + 10.1$

MM: dia da coleta =  $\text{delta} \times 1.35 + 8.8$ .

Em 54 casos foi realizada a determinação seriada do número de células CD34 + no sangue periférico no dia quando os leucócitos atingiram  $> 1 \times 10^9/\text{L}$ . Nestes pacientes, a correlação encontrada entre o dia da coleta e hemoglobina, dia dos neutrófilos  $< 1 \times 10^9/\text{L}$  e o dia do nadir. foi estatisticamente significativa e possibilitou desenvolver um modelo matemático separando os pacientes conforme a doença de base:

DH: dia da aférese =  $\text{delta} \times 1.5 + 9.1$

LNH: dia da aférese =  $\text{delta} \times 0.66 + 10.8$

MM: dia da aférese =  $\text{delta} \times 1.6 + 8.8$

De acordo com nosso estudo, cada doença apresenta sua dinâmica de mobilização, possivelmente relacionada com o número de linhas quimioterápicas prévias ou pelo status do microambiente medular. O parâmetro mais importante encontrado e comum a todos os pacientes foi a velocidade de queda dos neutrófilos após a quimioterapia de mobilização.

## ABSTRACT

---

Mobilized peripheral blood progenitor cells (PBPC) are able to engraft and restore hemopoiesis after myeloablative therapy. Intense chemotherapy with PBPC rescue is currently an important therapeutic approach in hematological malignancies such as non-Hodgkin's lymphoma (NHL), Hodgkin's disease (HD) and multiple myeloma (MM).

The most effective regimen and the adequate intensity of mobilization chemotherapy still remains to be defined and it has been clearly shown that the progenitor cell yield can be influenced by intensity of previous treatments. Several other parameters may affect the harvesting of PBPC after mobilization chemotherapy.

The purpose of our study was to establish the parameters that best predict the day to start harvesting of PBPC in order to collect most CD34+ cells with few aphereses.

We analysed retrospective data of patients with hematological malignancies treated in our Institution, who underwent mobilization to obtain PBPC in order to perform autologous bone marrow transplantation. Patients were mobilized with Cyclophosphamide (4 or 7g/m<sup>2</sup>) and G-CSF 300µg,sc, daily, aiming to collect 5x10<sup>6</sup> cells/Kg. We investigated the influence of age, sex, diagnosis, number of previous chemotherapy lines (nCHT), peripheral blood counts on day of mobilization, day of neutrophils < 1 x10<sup>9</sup>/L and day of nadir (including the interval between these two days) on harvesting. Multivariate linear correlation models were built in order to predict the day of best harvesting. We analysed 134 patients: 36HL, 65 NHL and 33 MM. Median age: 28, 40 and 48 respectively. The Pearson's test showed a correlation for day of leucocytes > 1 x10<sup>9</sup>/L with hemoglobin value of day 0, day of neutrophils < 1x10<sup>9</sup>/L, day of nadir and dosis of mobilization therapy. However, for each disease group a different model could be established:

HL: day of apheresis =  $\text{delta} \times 1.5 + 6.8$

NHL: day of aphereis =  $\text{delta} \times 0.88 + 10.1$

MM: day of apheresis =  $\text{delta} \times 1.35 + 8.8$ .

In 54 cases a serial determination of the number of CD34 + cells in peripheral blood was performed starting on day of peripheral leucocytes > 1 x10<sup>9</sup>/L. In these patients, a

correlation was found between the day of harvesting and hemoglobin, day of neutrophils  $<1 \times 10^9/L$  and day of nadir. Separating the patients for disease:

HL: day of apheresis =  $\text{delta} \times 1.5 + 9.1$

NHL: day of apheresis =  $\text{delta} \times 0.66 + 10.8$

MM: day of apheresis =  $\text{delta} \times 1.6 + 8.8$ .

According to this study, each disease has its own pattern of mobilization dynamics, possibly related to the amount of previous chemotherapy or the status of bone marrow microenvironment. The most important parameter, common to all patients, was the velocity of decline of the neutrophil count after mobilization chemotherapy.

# ***I. Introdução***

---

## **I.1. Considerações gerais**

O transplante com Células Progenitoras Periféricas Hemopoiéticas (CPPH) tem sido extensivamente explorado como terapêutica para cura de pacientes portadores de neoplasias hematológicas. Atualmente, mais e mais centros de tratamento têm utilizado as células progenitoras periféricas para transplante através da sua mobilização da medula óssea para o sangue periférico (FU e LIESVELD, 2000).

A utilização de CPPH do sangue periférico para transplante de medula óssea, iniciado na década de 1980, apresentou um aumento significativo ao longo dos últimos quinze anos e hoje, é a fonte predominante de resgate da hemopoiese após o tratamento quimioterápico mieloablativo (TO et al., 1997). Diferentes regimes de mobilização têm sido desenvolvidos desde então, seja com o uso de fatores de crescimento isolado, agentes quimioterápicos ou ambos associados (FU e LIESVELD, 2000).

As primeiras tentativas de transplante autólogo de medula óssea foram relatadas em 1950 (KURNICK et al., 1958). No final da década de 70, ocorreu o primeiro relato de sucesso com o uso de terapia de altas doses e transplante autólogo de medula óssea para pacientes portadores de linfoma (APPELBAUM et al., 1978). No início da década de 80, muitos dos detalhes técnicos relacionados ao procedimento foram resolvidos, e o uso deste tratamento tornou-se possível para pacientes portadores de linfomas progressivos, que acabou ocorrendo no final da mesma década. Dois outros avanços importantes ocorreram nesta época. O primeiro foi o reconhecimento de que o progenitor hematopoiético circulava no sangue periférico e poderia ser coletado para fim de transplante após a realização de aféreses consecutivas (KORBLING et al., 1986),(KESSINGER et al., 1986). O outro foi o reconhecimento de que os fatores de crescimento hemopoiéticos aumentavam a eficiência da coleta dos precursores circulantes e aceleravam a recuperação hemopoiética após o transplante (KESSINGER et al., 1986). Essas observações, somadas às melhorias técnicas dos cuidados de suporte, tornaram o transplante autólogo de CPPH um procedimento seguro e com baixas taxas de mortalidade relacionadas ao procedimento. Estas taxas caíram de 30% na década de 80 para 1-2% nos anos 90 (BENNETT et al., 1995).

Assim, o transplante autólogo de CPPH trouxe uma alternativa terapêutica extremamente importante e eficaz para os pacientes portadores de linfomas agressivos recidivados e refratários a tratamentos convencionais. Vários estudos demonstram benefícios para esses pacientes que ainda são quimiossensíveis. As taxas de sobrevida global, em 2 a 5 anos, variam de 60% a 30% e sobrevida livre de doença de 51 a 27% (MAJOLINO et al., 1997), (MILLS et al., 1995), (SANTINI et al., 1999), (STEIN et al., 2000).

## **I.2. As Células Progenitoras Hemopoiéticas (CPH)**

São precursores comuns aos elementos hemopoiéticos presentes na medula óssea e que podem circular no sangue periférico. As células circulantes alojam-se na intimidade das células estromais da medula óssea, que são os fibroblastos, os macrófagos, as células endoteliais e os adipócitos, através de um mecanismo de tropismo a esse meio ambiente, dado por moléculas de adesão presentes em sua superfície. Morfologicamente, não podem ser individualizadas, por serem semelhantes a linfócitos.

As CPH dão origem aos precursores de todas as células sanguíneas (GEMM), séries granulocítica, eritróide, monocítica e megacariocítica e um precursor da série linfóide, que depois se diferenciará em linfócitos B e T.

A diferenciação das células troncos em cada um dos componentes se dá através de fatores de crescimento, produzidos por órgãos como o fígado e os rins, obedecendo a estímulos do meio. Assim ocorre com a eritropoetina (EPO) que é produzida pelo rim quando há baixa concentração de O<sub>2</sub> e estimula a diferenciação da célula totipotente para CFU-E. Fatores como a IL-1 e o TNF (fator de necrose tumoral) agem sobre as células estromais da medula, estimulando-as a produzirem o fator de estímulo à formação de colônias granulocíticas (G-CSF) e granulocíticas e macrofágicas (GM-CSF) (ABRAMSON et al., 1977).

Os fatores de crescimento podem agir na diferenciação e na regulação do crescimento de células mais maduras, através da inibição da apoptose. Estes fatores (EPO, G-CSF, GM-

CSF) são usados na prática clínica para estimular a produção destas séries pela medula óssea.

As CPHs, em condições habituais, estão em número muito reduzido na circulação periférica (UDOMSAKDI et al., 1992). Elas correspondem a 0.01 a 0.05% do total de células nucleadas da medula óssea. Distinguem-se das demais células hemopoéticas pela sua capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação.

A expressão do antígeno CD34 é freqüentemente utilizada na prática clínica como marcador para a CPH (FRUEHAUF et al., 1995),(KORBLING e ANDERLINI, 2001).

### **I.3. Identificação e quantificação das CPPHs**

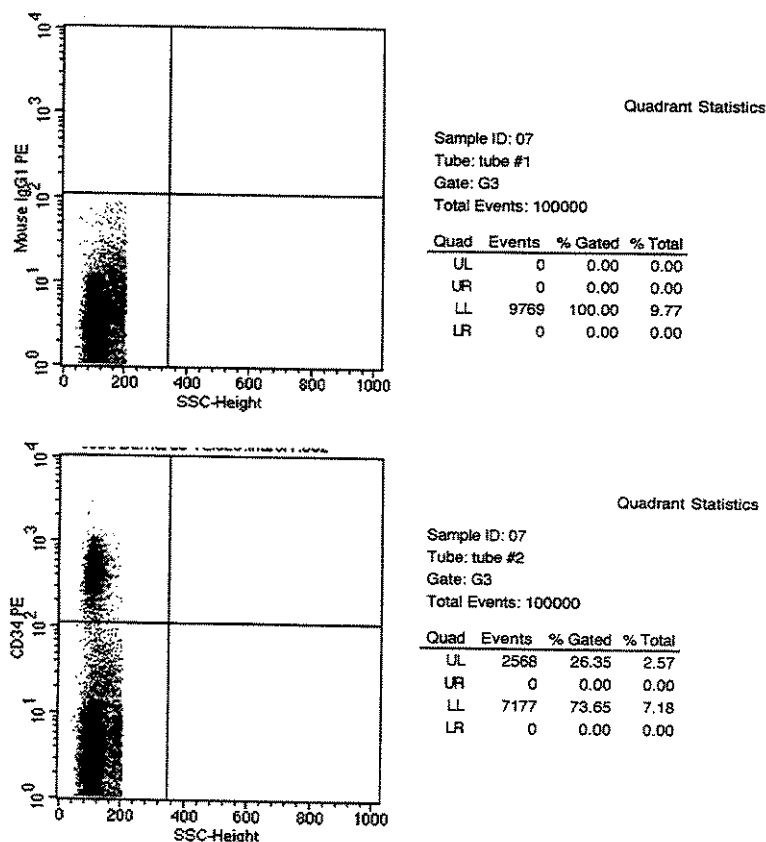
O número de células progenitoras periféricas circulantes aumenta consideravelmente durante a fase de recuperação após uma quimioterapia mielossupressora como a Ciclofosfamida (KRIEGER et al., 1999).

Os fatores de crescimento hemopoiéticos contribuem também para o importante aumento do número de células progenitoras no sangue periférico. Quando combinada quimioterapia com fator de crescimento, ocorre efeito sinérgico resultando num aumento ainda mais expressivo de CPPH. Assim, uma grande quantidade de CPPH pode ser coletada após um regime de mobilização (DEMIRER et al., 1996a).

A quantificação das células progenitoras no sangue periférico e no produto da aférese, pode ser determinada através da contagem das unidades formadoras de colônias granulocítico-macrofágica (CFU-GM) por técnicas de cultura de células, sendo considerada boa preditora para a reconstituição hemopoiética após quimioterapia mieloablativa (JUTTNER et al., 1989). Porém, a informação só é disponível cerca de duas semanas após o início da cultura.

O antígeno CD34, marcador de superfície, também identifica a população de células progenitoras contidas no sangue periférico. Estas células, denominadas células CD34+, podem ser quantificadas por citometria de fluxo (SIENA et al., 1991), (D'ARENA et al.,

1996), fornecendo informações comparáveis aquelas obtidas nos estudos de CFU-GM (D'ARENA et al., 1996).



**Figura 1:** Foto demonstrativa da quantificação de CD34+ no sangue periférico por citometria de fluxo.

#### I.4. Mobilização das células progenitoras para o sangue periférico

Um único ou múltiplos sinais de stress interferem com o equilíbrio da homeostase, criando uma situação de alarme, levando a um aumento da produção de células imaturas na medula óssea que acabam migrando para o sangue periférico. Este fenômeno ocorre naturalmente frente a um processo inflamatório ou de injúria celular.

Por exemplo, o aumento dos níveis de G-CSF e outras citocinas secretadas durante uma maratona por corredores causa leucocitose, com aumento dos níveis de células CD34+, refletindo uma adaptação da medula óssea frente ao stress induzido pelo esforço físico (BONSIGNORE et al., 2002).

Esta situação acabou sendo reproduzida em modelos animais submetidos ao processo de injúria ou inflamação: quebra de DNA, uso de drogas quimioterápicas isoladas como ciclofosfamida ou regimes de quimioterapia combinada como ICE (Ifosfamida, Carboplatinum, Etoposido), Ara-C e Cisplatina (ESHAP), uso de citocinas como G-CSF, GM-CSF e outros como IL-8 (LAPIDOT e PETIT, 2002), (COTTLER-FOX et al., 2003).

#### **I.4.1. Biologia do Fenômeno de Mobilização.**

O fenômeno da mobilização pode ser entendido como o recrutamento de CPH para o sangue periférico depois de realizado o tratamento quimioterápico ou utilizado citoquinas (fator de crescimento hemopoiético) (FU e LIESVELD, 2000).

Este processo mimetiza o que ocorre fisiologicamente quando, a partir de um sinal de stress medular durante quadro inflamatório ou de injúria celular, a medula óssea libera para o sangue periférico as células progenitoras (FU e LIESVELD, 2000).

A medula óssea humana pode ser dividida em dois compartimentos: vascular e o extravascular. A hemopoiese ocorre exclusivamente no compartimento extravascular. Entre estes dois compartimentos existe uma camada de sinusóides que formam barreira entre sangue / medula óssea e apresentam um estreito endotélio (TO et al., 1997). Assim, a mobilização de CPH ocorre nos locais onde estas células deixam de ter o suporte estromal e migram através do endotélio para o compartimento vascular.

Alterações nos antígenos de superfície, na expressão das moléculas de adesão, no estado de proliferação e na resposta a fatores de crescimento hemopoiéticos e citoquinas estão associados neste processo (KROGER et al., 1998b),(PEREY et al., 1998).

Utilizando o antígeno CD34 como marcador das CPPH pode-se detectar uma quantidade de células progenitoras hemopoiéticas que circula no sangue periférico. Estas são encontradas em G0 / G1 do ciclo celular. Elas estão em prontidão para iniciar o ciclo assim que expostas a citocinas hemopoiéticas, *in vitro*, em contraste da célula progenitora hemopoiética da medula óssea a qual apresenta uma latência maior e alta porcentagem de células em fase de proliferação fase S. As mudanças nos antígenos de superfície e expressão das moléculas de adesão são diferentes nestes dois grupos de células (PECORA, 1999). Para exemplificar, um aumento dos níveis de L-selectina e a diminuição do VLA-4 é notado nas células primitivas CD34 + que foram mobilizadas para a circulação. A expressão de c-kit (receptor de fator de stem cell - CD117) e expressão de CXCR4 (receptor para célula estromal derivado do fator 1) estão diminuídos em ambos: CD34+ encontrados tanto na medula óssea como nas CD34+ mobilizadas encontradas na circulação (BELLUCCI et al., 1999).

É interessante estabelecer as relações entre os diferentes mecanismos que envolvem a mobilização das CPH e definir o papel e a seqüência dos diferentes fatores na via comum para induzir a mobilização.

Na fase de *iniciação*, agentes mobilizadores como o G-CSF agem primeiramente para dar início à reação que induz a mobilização.

Os fatores de crescimento hemopoiéticos e citocinas são demonstrados em vários trabalhos clínicos como eficazes e seguros agentes mobilizadores tanto para o transplante de medula óssea autólogo como alogênico (FU e LIESVELD, 2000), (WATANABE et al., 1997). A cinética da mobilização é alcançada de alguns minutos a vários dias com alguns fatores de crescimento (FU e LIESVELD, 2000).

A importância dos fatores de crescimento e das citocinas no processo de mobilização é que funcionam não apenas como gatilho, como também ativam transmissores, funcionando diretamente como atraentes químicos na emigração e atuam na sobrevivência da célula progenitora mobilizada para o sangue periférico (WATANABE et al., 1997). Devido a sua potência e a falta de sérios efeitos colaterais, o G-CSF é o agente

mobilizador mais comumente utilizado. Ele inicialmente atua nas células da linhagem mielóide e nas células endoteliais.

A administração de G-CSF aumenta significativamente a porcentagem e número absoluto de CD34+ no sangue periférico, com similar expressão de CD13, CD33, CD38, HLA-DR e CD90, porém baixa a expressão de c-kit (CD117), VLA4, VLA5, LFA1, LFA3 e L-selectina comparados às células latentes (LATAILLADE et al., 2000). A diminuição de resposta a SDF1 (fator 1 derivado da célula estromal) induz quimiotaxia através da migração transendotelial que ocorre através do decréscimo de expressão de CXCR4; diminui a capacidade de adesão do estroma e diminui a porcentagem de células CD34+ em fase ativa do ciclo celular (LIU et al., 1997).

A administração de G-CSF aumenta a angiogênese e o fluxo sanguíneo na medula óssea e estimula a capacidade colonogênica em todos os progenitores avaliados.

Outros fatores incluindo GM-CSF podem induzir a produção de IL-8. A IL-8 é o exemplo mais característico e capaz de mobilizar CPH a 100 vezes em 1 hora. Após a administração única da IL-8 a neutropenia pode ser observada após alguns minutos e neutrofilia após algumas horas, associada a um aumento de fator de crescimento circulante (FU e LIESVELD, 2000), (PRUIJT et al., 1999).

O aumento da IL-8 pode estimular rápida produção de metaloproteinases como gelatinase B a qual (PRUIJT et al., 1999) quebra a matriz extracelular da medula óssea e mobiliza CPH através da barreira sangue / medula óssea (FIBBE et al., 2000).

As CPH estão circundadas por células estromais como fibroblastos, adipócitos, macrófagos e células endoteliais, e outras células progenitoras. Existe intensa interação entre célula - célula e célula – matriz através do sistema de moléculas de adesão que inclui: integrinas, imunoglobulinas, selectinas e moléculas de proteoglicans (FIBBE et al., 2000).

As integrinas são glicoproteínas (alfa e beta) que mediam as interações célula-célula, e também servem como sinal para migração, proliferação, diferenciação e apoptose. Este sistema é complexo e existem receptores ou ligantes expressos tanto nas CPH como nas células estromais.(LATAILLADE et al., 2000)

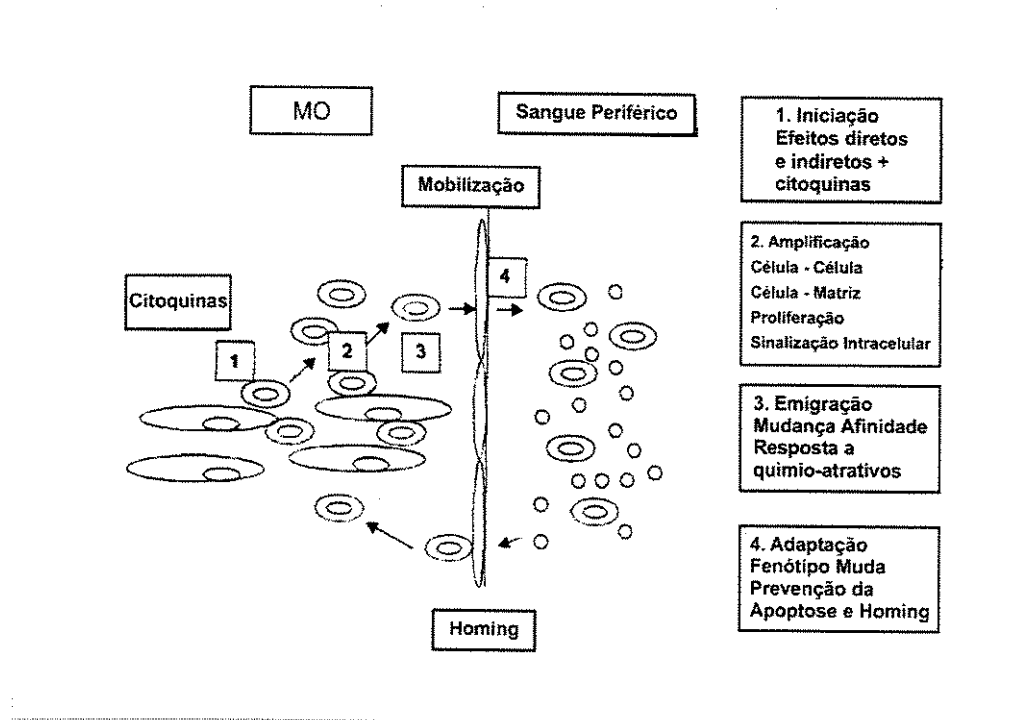
Distúrbios de adesão entre CPHs e microambiente medular por agentes mobilizantes resultam na sua liberação (FU e LIESVELD, 2000). As integrinas VLA-4, LFA1 e L-selectina também participam deste processo de mobilização (BELLUCCI et al., 1999).

Na fase da *amplificação*, ocorre interação entre CPH, microambiente medular e os sistemas: fator de crescimento, citoquinas, interação célula - célula e célula – matriz. Isto resulta na *proliferação* e mudanças fenotípicas das CPH e o preparo destas para a próxima fase que é a *emigração*. Esta etapa se dá através de sinusóides próximos às células de junção interendotelial e regiões onde a membrana da matriz extracelular é muito fina ou ausente. A matriz da medula óssea é composta de colágenos, glicoproteínas, glicosaminoglicans e metaloproteinases, incluindo gelatinases e collagenases (FIBBE et al., 2000).

Uma injúria na barreira sangue-medula óssea e a destruição de CPH maduras por agentes quimioterápicos são suficientes para desencadear o processo de mobilização. As metaloproteinases são grupos de enzimas que degradam a matriz extracelular da medula óssea durante a indução da mobilização (JANOWSKA-WIECZOREK et al., 1999). Ainda na fase de *emigração*, as CPH também perdem suas respostas aos atraentes químicos do estroma, diminuindo sua atividade de adesão ao microambiente da medula óssea e após saem para o sangue periférico através da camada do endotélio.

Obviamente, o dano nesta camada de endotélio talvez facilite, mas não necessariamente resulte na mudança da CPH para dentro do sangue periférico caso não haja mudanças nas CPH e no microambiente medular.

Na fase de *adaptação*, a modificação da CPH na sua condição de mobilizada lhe dá chance de sobreviver no sangue periférico (WHETTON e GRAHAM, 1999).



**Figura 2:** Modelo do processo da mobilização (FU e LIESVELD, 2000).

## **I.4.2. Estratégias para mobilização de CPPH.**

### **I.4.2.a. Quimioterapia mielossupressora isolada.**

A quimioterapia mielossupressora foi a primeira utilizada como protocolo para a mobilização de CPPH (REIFFERS et al., 1986), (KORBLING et al., 1986), (TO et al., 1984). Em diversos estudos clínicos (REIFFERS et al., 1986), (SCHWARTZBERG et al., 1992) foi demonstrado que após a recuperação da fase de aplasia pós-quimioterapia, ocorre um aumento significativo de células progenitoras no sangue periférico, que acaba sendo proporcional à severidade e duração das citopenias. A Ciclofosfamida (CY) em altas doses é o protocolo mais comumente utilizado por vários centros hematológicos (KORBLING et al., 1986), (TO et al., 1989), (ROWLINGS et al., 1992), (KOTASEK et al., 1992).

A grande limitação da mobilização com quimioterapia é a ocorrência de sepse, sangramento e a falta de previsão do melhor momento para se iniciar a aférese, visto que,

cada paciente responde de forma diferente frente à quimioterapia mielossupressora quanto à recuperação medular (TO et al., 1997). Rowlings et al (1992)(ROWLINGS et al., 1992) relataram que, de 60 pacientes submetidos à CY em altas doses, 18% necessitaram de transfusão de concentrado de plaquetas e 3 % evoluíram para óbito pós-choque séptico. A toxicidade deste protocolo foi demonstrada também por Kotasek et al (1992) e Jagannath et al (1992)(JAGANNATH et al., 1992). Outros regimes quimioterápicos foram utilizados para mobilização em situações específicas, como mini-ICE para pacientes com leucemia mielóide crônica (CARELLA e FRASSONI, 1996) e DHAP para pacientes com Linfoma não-Hodgkin avançado (VELASQUEZ et al., 1988).

A mobilização usando apenas quimioterapia foi utilizada na década de 1980 e até início de 1990. Com o advento do uso clínico de fatores de crescimento hemopoiéticos, a quimioterapia isolada deixou de ser utilizada como protocolo de mobilização (TO et al., 1997), (LEFRERE et al., 1999b).

#### I.4.2.b. Fator de crescimento isolado.

A utilização de fator de crescimento na mobilização foi inicialmente reportada em 1988 com relatos do efeito de G-CSF e GM-CSF. Mais tarde, se descreveu a reconstituição hemopoiética nos pacientes transplantados usando somente o fator de crescimento como mobilizador de células progenitoras periféricas (MIELCAREK e TOROK-STORB, 1997).

A cinética da mobilização de CPPH é similar com diferentes fatores de crescimento. O pico de células progenitoras no sangue periférico ocorre após 5 a 10 dias de tratamento (KAWANO et al., 1999), (LI et al., 1999). Um largo espectro de células hemopoiéticas é mobilizada, incluindo CPH, progenitores das séries megacariocítica, eritroblástica, e progenitores mielóides bem como neutrófilos maduros. No entanto, a eficácia da mobilização não é similar entre os diferentes fatores de crescimento, apresentando contagens de células progenitoras periféricas em níveis abaixo do ideal esperado (KROGER et al., 1999), (LEFRERE et al., 1999a).

O G-CSF é o fator de crescimento mais utilizado para mobilização (KOLBE et al., 1997), (WEAVER e TESTA, 1998). Ele apresenta uma ação sinérgica com outros fatores

de crescimento para induzir a mobilização. O efeito máximo ocorre em torno do quinto dia de administração. O escalonamento de doses para  $16\mu\text{g} / \text{Kg} / 12 \text{ hs}$  é bem tolerado e resulta numa coleta com maior número de CPPH em doadores sadios (KROGER et al., 1998a). Noventa e nove por cento dos doadores de medula óssea estimulados com G-CSF obtiveram numa simples aférese mais de  $2 \times 10^6 \text{ CD34} + / \text{Kg}$  de peso do receptor. A combinação entre G-CSF com GM-CSF, seja ela sequencial ou concomitante tem sido relatada ser mais eficaz que a mobilização com G-CSF sozinho (SPITZER et al., 1997), (FISCHMEISTER et al., 1999).

#### I.4.2.c. Quimioterapia associada a fator de crescimento.

A administração de agentes quimioterápicos, seguida de administração diária de fator de crescimento, proporciona uma mobilização mais efetiva quando comparados com quimioterapia ou fator de crescimento isolado (DEMIRER et al., 1997), (DEMIRER et al., 1996a). Esta combinação apresenta o máximo efeito entre o sétimo e o décimo quarto dia após a infusão da quimioterapia, quando se inicia a recuperação medular pós-nadir e o aumento dos glóbulos brancos do sangue periférico (WATANABE et al., 1999). Acrescenta-se ainda, o importante efeito antitumor proporcionado pela quimioterapia.

Entre os vários regimes de mobilização, o agente quimioterápico isolado como a CY ou paclitaxel (BURTNESSE et al., 1999) podem ser utilizados em combinação com G-CSF para mobilizar CPPH. Regimes que associam quimioterapia e fatores de crescimento são seguros e geralmente bem tolerados, com grande capacidade de agir na célula tumoral e mobilizar CPPH. Alguns exemplos de regimes bem tolerados e usados são: o mini-ICE (Ara-C, Idarrubicina, e Etoposide associado ao G-CSF) (SUREDA et al., 1999) para leucemia mieloide crônica, esquema IVE (Ifosamida, Etoposide e Epirrubicina associado ao G-CSF), (MCQUAKER et al., 1999) em linfomas, CY  $7\text{gr}/\text{m}^2$ , seguido de VP  $2\text{gr}/\text{m}^2$  para linfomas (GIANNI et al., 1992), entre outros.

Atualmente, esquemas de mobilização utilizando-se altas doses de CY (4 ou  $7 \text{ g}/\text{m}^2$ ) seguidas por fatores de crescimento hemopoiético recombinantes, são os mais amplamente

utilizados (DREYFUS et al., 1992), (GOLDSCHMIDT et al., 1996; TARELLA et al., 1991). A quimioterapia de altas doses seguida de transplante autólogo de CPPH para a terapia de salvamento nos linfomas e outros tumores foi um grande avanço na terapêutica destes doentes (VIGORITO et al., 1998).

## **I.5. Coleta das Células Progenitoras Periféricas Hemopoiéticas**

### **I.5.1. Procedimento de Leucoaférese**

As CPPH são coletadas por máquinas de hemaférese. O princípio destes equipamentos é baseado no processamento do sangue em um circuito extra-corpóreo, separando os diversos componentes por métodos de centrifugação e/ou filtração. A separação dos diversos componentes do sangue por centrifugação é possível pela diferença da densidade existente entre eles.

Os equipamentos de hemaférese por centrifugação podem ser de fluxo contínuo ou descontínuo. Os equipamentos de fluxo contínuo são, em geral, mais avançados, permitindo procedimentos mais qualificados, rápidos e maior estabilidade hemodinâmica.

Com estes equipamentos é possível a realização de procedimentos de coleta de CPPH destinadas a transplantes autólogos e alogênicos, a partir da circulação periférica. Para otimizar a coleta de CPPH, é razoável aguardar pelo menos 1 hora após a injeção do fator de crescimento, tentando-se um melhor momento no qual ocorrerá o maior pico de leucócitos no sangue periférico (MONCADA et al., 2003).

### **I.5.2. Quantidade de CPPH para enxertamento**

Vários estudos sugerem que o número alvo de células CD34+ a serem infundidas seja em torno de  $5 \times 10^6$  CD34+/ Kg de peso do paciente, para que ocorra a recuperação de neutrófilos, plaquetas e hemoglobina (PEREA et al., 2001; TRICOT et al., 1995). Por isto, este é o alvo mais usado. Porém muitos centros de transplante também consideram o valor

de  $2 \times 10^6/\text{Kg}$  do paciente aceitável para que a recuperação hematológica ocorra após o transplante de CPPH (GANDHI et al., 1999).

O melhor indicador para a recuperação da hemopoiese nos transplantes autólogos é a quantidade de células CD34+ / Kg do paciente infundida.

Ainda existem algumas controvérsias acerca da quantidade destas células que deve ser infundida para que ocorra um enxertamento seguro e eficaz após o transplante, mas os valores mais largamente aceitos estão entre  $2.2$  e  $5.0 \times 10^6/\text{Kg}$  (KORBLING et al., 1995), (HAAS et al., 1994), (PASSOS-COELHO et al., 1995), (TRICOT et al., 1995), (D'ARENA et al., 1998).

### **I.5.3. Parâmetros para determinar a coleta das CPPH.**

Vários critérios têm sido usados para se definir qual o melhor momento para a realização de leucaféreses incluindo a contagem leucocitária periférica absoluta, a cinética da recuperação leucocitária, a contagem plaquetária e a concentração de células CD34+ circulantes no sangue periférico (TO et al., 1992), (HANSSON et al., 1995), (GIANNI et al., 1989), (SIENA et al., 1989).

D'Arena et al, 1998 (D'ARENA et al., 1998) mostraram que quando a contagem leucocitária periférica atinge  $1.0 \times 10^9/\text{L}$  após a recuperação do nadir, uma quantidade suficiente de células CD34+ pode ser coletada por leucaférese.

Com o advento da quantificação de células CD34+ no sangue periférico por citometria de fluxo, foi proposto o início da coleta de CPPH quando a contagem leucocitária após a recuperação do nadir atinge  $1.0 \times 10^9/\text{L}$  e a quantidade de células CD34+ no sangue periférico for maior que  $20/\mu\text{L}$ . Este é o protocolo mais utilizado na prática clínica (HAAS et al., 1994), (D'ARENA et al., 1997), (D'ARENA et al., 1998).

#### **I.5.4. Fatores que influenciam a coleta de CPPH.**

A influência do diagnóstico da doença de base dos pacientes submetidos ao processo de mobilização e coleta de CPPH foi descrita por alguns autores, e foi evidenciado que os pacientes portadores de neoplasias hematológicas possuem uma capacidade de mobilização de CPPH pior quando comparados aos pacientes portadores de tumores sólidos, como neoplasia de mama ou testículo. Provavelmente, em decorrência da maior quantidade de tratamentos prévios realizados nos pacientes portadores de neoplasias hematológicas (D'ARENA et al., 1998), (WEAVER et al., 1998), (GAZITT et al., 1999), (SAUTOIS et al., 1999).

Em relação à idade, os estudos parecem ser controversos. Em crianças não foi comprovada relação entre a idade e o número de CPPH coletadas (KANOLD et al., 1998), (WITT et al., 2001). Em recente trabalho realizado com pacientes portadores de mieloma múltiplo, com idade acima de 70 anos, foi demonstrado que tanto a mobilização foi bem tolerada, como a coleta foi satisfatória (MORRIS et al., 2003).

O mesmo ocorre em relação ao sexo, onde alguns autores descrevem que as mulheres apresentam uma probabilidade maior de falharem na mobilização quando comparadas com os pacientes do sexo masculino (PEREA et al., 2001). Estudos realizados com crianças, não comprovaram correlação significativa entre o número de CPPH coletadas com o sexo das mesmas (WITT et al., 2001).

A medula óssea infiltrada não é um fator independente negativo para o processo da mobilização de CPPH. A redução da infiltração tumoral pelo tratamento aumenta as chances da mobilização ocorrer de forma favorável (TARELLA et al, 1999). Nos pacientes portadores de mieloma múltiplo, os resultados são contraditórios. Alguns autores relatam que a medula óssea infiltrada prejudica uma coleta de CPPH adequada (DEMIRER et al., 1997; KETTERER et al., 1998). Em relação aos tratamentos prévios que os pacientes receberam, vários estudos demonstraram que radioterapia e linhas quimioterápicas prévias com agentes alquilantes (melphalan, carmustina) afetam adversamente a mobilização (WATTS et al., 1997), (KETTERER et al., 1998), (MARIT et al., 1998), (PEREA et al., 2001). Particularmente, o melphalan é muito mielotóxico e mesmo a sua utilização oral e

em baixas doses antes da mobilização resulta numa redução de células CD34+ mobilizadas (TRICOT et al., 1995), (GOLDSCHMIDT et al., 1997). Já foi comprovado em vários estudos que a utilização da fludarabina pré-mobilização está associada com uma mobilização pobre, (KETTERER et al., 1998) assim como a utilização de outros agentes mielotóxicos como a mostarda nitrogenada e a procarbazina (MOSKOWITZ et al., 1998).

Vários estudos também avaliaram os regimes de mobilização. A ciclofosfamida é a droga de escolha seja na dose de 1 a 7 g/m<sup>2</sup>. Foi demonstrado que Ciclofosfamida 4 g/m<sup>2</sup> é equivalente à dose de 7 g/m<sup>2</sup> em relação à eficiência da mobilização (GOLDSCHMIDT et al., 1997). Pacientes portadores de mieloma múltiplo que foram submetidos a regimes combinados com Ifosfamida e Epirrubicina associados a fator de crescimento chegaram a apresentar efeitos colaterais sérios (ARLAND et al., 2001). Alguns esquemas quimioterápicos combinados com cisplatina parecem ser menos efetivos quando comparados com a ciclofosfamida (KURATA et al., 2000).

Recentemente, alguns trabalhos têm abordado algumas variáveis associadas ao paciente. Marques et al (2000)(MARQUES et al., 2000) relataram em seu estudo com 41 pacientes que a recuperação leucocitária precoce pós-quimioterapia mielossupressora prediz que será necessário um menor número de aféreses, com maior número de células CD34+ coletadas. Um estudo realizado com ratos demonstrou que a eficácia da mobilização parece estar envolvida com alguns genes localizados nos cromossomos 2 e 11 (HASEGAWA et al., 2000). Estudos prospectivos são necessários para confirmar se o nível de expressão de marcadores moleculares como CXCR4 ou VLA-4, podem predizer a capacidade de mobilização destes pacientes.

Tendo em vista a necessidade de se coletar um grande número de CPPH em pacientes que muitas vezes já sofreram tratamentos prévios e têm pouca reserva medular, estudamos a possibilidade de otimizar a coleta, obtendo o dia exato em que é possível colher o maior número de CPPH com o menor número de aféreses.

Examinamos, como fatores preditores, parâmetros clínicos e laboratoriais de rotina facilmente aplicáveis em qualquer Serviço de transplante de medula óssea.

## ***II. Objetivos***

---

- Estudar os fatores que influenciam na quantidade de CPPH colhidas por aférese em pacientes com neoplasias hematológicas, submetidos a mobilização de CPPH para transplante autólogo.
- Calcular a partir de dados da evolução do hemograma após a megaterapia, o melhor dia para a coleta.
- Verificar, através da evolução do número de células CD34+ no periférico se é possível prever o dia ideal para a coleta de CPPH.
- Elaborar um modelo matemático para a previsão do dia do início da coleta das CPPH e assim, otimizar o procedimento da aférese dos pacientes submetidos à mega-quimioterapia conforme a doença de base e tratamento prévio já realizado.

### ***III. Casuística e Métodos***

---

### **III.1. Pacientes**

Foram selecionados para o estudo pacientes portadores de doenças onco-hematológicas acompanhados no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Unicamp.

Todos os pacientes realizaram estadiamento completo da doença de base previamente à CY em altas doses, que foi definido conforme exames laboratoriais e exames de imagem (tomografia computadorizada, RX, ultra-sonografia).

Foram analisados então, os pacientes submetidos à quimioterapia de altas doses para a coleta de células progenitoras periféricas hematológicas (CPPH) para Auto-Transplante de Medula Óssea.

Analisamos dois grupos de pacientes: análise retrospectiva de pacientes mobilizados que realizaram aférese quando o número de leucócitos atingiu  $1 \times 10^9/L$  e um estudo prospectivo de pacientes que iniciaram contagem de células CD34+ no sangue periférico quando a contagem de leucócitos atingiu  $1 \times 10^9/L$ . Nestes pacientes, a contagem de células CD34+ foi realizada diariamente até pelo menos três dias após o fim do(s) procedimento(s) de aféreses.

### **III.2. Avaliação Clínica**

Os dados relativos à identificação, história e dados laboratoriais foram obtidos a partir do atendimento e informações do prontuário dos pacientes. Foram usados como dados de identificação o nome, a idade, o sexo e o número do prontuário (HC).

O estadiamento clínico foi avaliado pelo sistema Ann Arbor para pacientes portadores de Linfoma Não-Hodgkin e Doença de Hodgkin. Para os pacientes portadores de Mieloma Múltiplo utilizamos o sistema de estadiamento Durie-Salmon (DURIE e SALMON, 1975).

### **III.3. Critérios de Inclusão para mega-quimioterapia**

Idade: pacientes adultos com Linfoma Não-Hodgkin e Doença de Hodgkin com menos de 60 anos, pacientes com Mieloma Múltiplo de até 65 anos;

Peso: peso mínimo estimado de 30 quilos;

*Casuística e Métodos*

Pacientes com o diagnóstico firmado de Mieloma Múltiplo, Linfoma Não-Hodgkin e Doença de Hodgkin;

"ECOG performance status" entre 0 - 2, apresentando funções cardíaca, pulmonar, renal e hepática normais;

Sorologias negativas para HIV, HTLV I, II, Hepatites virais B e C.

### **III.4. Regime de Mobilização de Células Progenitoras Periféricas Hematológicas (CPPH)**

O processo de mobilização das CPPH para o sangue periférico compreende o período entre o primeiro dia de infusão da quimioterapia, definido como dia zero (D0), até o dia do último procedimento de aférese para coleta de CPPH.

O esquema quimioterápico utilizado para a mobilização foi a infusão de Ciclofosfamida na dose de 4 ou 7 g/m<sup>2</sup>, divididos em três ou cinco doses respectivamente (SANTINI et al., 1999), conforme Protocolo Institucional ( anexos I e II ).

Os pacientes receberam fator de crescimento hemopoiético (rh-CSF-Granulokine®, Roche, São Paulo-Brasil) a partir do dia seguinte à quimioterapia (D1), por via sub-cutânea, na dose única de 300µg ao dia até o último dia de coleta por leucoaférese.

Foi realizada a implantação de catéter tunelizado de duplo lúmen nos pacientes, tipo Hickman, calibre 13,5 (Bard Access Systems, Salt Lake City, Utah, USA) a fim de promover maior conforto no que diz respeito à infusão de quimioterápicos, medicações, antibióticos, hemocomponentes, coleta de exames laboratoriais, bem como a realização do procedimento de leucaférese.

Após a infusão da Ciclofosfamida, os pacientes permaneceram internados e foram acompanhados com a realização de hemograma e contagem de plaquetas diariamente.

### **III.5. Cuidados de Suporte**

Durante o período de mobilização, os pacientes receberam como profilaxia para infecção fúngica o fluconazol na dose de 200mg ao dia, por via oral e ciprofloxacina na dose de 500 mg por via oral ao dia como profilaxia para infecções bacterianas.

A partir da contagem de granulócitos zero, os pacientes receberam cefepime por via endovenosa, na dose de 2000 mg de 12/12 hs ao dia. Na fase de neutropenia febril, foram colhidas hemoculturas do sangue periférico e das duas vias dos catéter, bem como realização dos exames de rotina para infecção: RX tórax, urina I e urocultura. O ajuste da antibioticoterapia foi realizado conforme positividade das culturas microbiológicas.

Os pacientes receberam concentrados de hemáceas irradiadas quando nível de hemoglobina permaneceu abaixo de 8,0g/dl. Concentrados plaquetários irradiados foram transfundidos quando a contagem plaquetária apresentou nível abaixo de  $10 \times 10^9/L$  ou, quando os pacientes apresentavam quadro febril associado à contagem de plaquetas inferior a  $20 \times 10^9/L$ . Na ocorrência de complicações hemorrágicas ou realização de procedimentos invasivos, os pacientes também receberam hemocomponentes. Todos os produtos hemoterápicos foram irradiados a 20Gy, conforme protocolo da Instituição.

Durante o procedimento de leucaférese, os pacientes permaneceram com monitorização cardíaca e ficaram em repouso por 40 minutos após o término do procedimento. A determinação da pressão arterial, pulso arterial, temperatura e frequência respiratória foram realizadas pré e pós-procedimento, e quantas vezes foram necessárias durante o procedimento.

### **III.6. Coleta das CPPH.**

#### **III.6.a. Início do procedimento**

A leucoaférese foi iniciada quando a contagem leucocitária periférica chegou em  $1.0 \times 10^9/L$  após o período de aplasia induzida pela quimioterapia, em 80 pacientes (critério um). Em 54 casos prospectivos, quando a contagem leucocitária periférica atingiu  $1.0 \times 10^9/L$  foi realizada a quantificação de células  $CD34^+$  circulantes no sangue periférico.

Estes pacientes foram submetidos ao procedimento de leucaférese quando o número de leucócitos no sangue periférico atingiu mais que  $1.0 \times 10^9/L$  e a contagem de CD34+ do sangue periférico encontrava-se acima de  $10/\mu L$  (critério dois). Após o término das leucaféreses destes pacientes, realizamos o monitoramento da quantificação de CD34+ no sangue periférico juntamente com a realização do hemograma, em dias alternados, num total de três contagens.

O objetivo foi coletar mais que  $5 \times 10^6$  células CD34+/Kg peso do paciente. A administração diária de fator de crescimento foi interrompida depois de realizada a última leucaférese.

Os procedimentos foram interrompidos quando se atingiu o alvo de coleta de  $5 \times 10^6/Kg$ ; a contagem leucocitária pré-procedimento chegou a  $30 \times 10^9/L$  ou a quantificação de células CD34+ pré-procedimento diminuiu ou permaneceu baixa.

Explicações detalhadas acerca do procedimento de leucaférese e potenciais complicações foram fornecidas a todos os pacientes, através de termo de consentimento informado (Anexo III).

### **III.6.b. Equipamentos utilizados**

Os procedimentos de leucaféreses foram realizados na seção de procedimento especializado do Hemocentro - Unicamp. Os equipamentos de fluxo contínuo utilizados foram Dideco Vivacell modelo BT-798 CE/A (Mirandola, Italy), kit 460F-405, Baxter CS3000 Plus (Fenwall Laboratories, Deerfield, IL, USA) e Fresenius AS 104 (Fresenius, Schweinfurt, Germany), Kit C4Y, programa PBSC/LYM.

Foi utilizada a solução anticoagulante ACD fórmula A (Citrato de sódio  $2H_2O$ ;  $22g/L$ ; Glicose  $H_2O$ :  $24,5g / l$ ; Ácido cítrico:  $7,3g / l$ ), sem heparina, infundida em proporção de 1:10 em relação ao sangue retirado, sendo esta proporção reduzida durante o procedimento até 1:16.

O fluxo sanguíneo de retirada variou de 40 a 70 ml por minuto, dependendo das condições do catéter e do conforto do paciente, sendo processado em média 12 litros de volume sanguíneo por sessão.

### **III.6.c. Controle de qualidade e armazenamento das CPPH**

O controle de qualidade do concentrado de CPP foi feito através da determinação da hemoglobina, da contagem leucocitária global, contagem de plaquetas e da determinação de células CD34<sup>+</sup> coletadas. Também foi realizada cultura bacteriológica de todos os concentrados de CPPH. Após a coleta, o produto final foi encaminhado para o laboratório de criobiologia, para preparação e congelamento.

### **III.7. Quantificação das Células CD34<sup>+</sup> e contagens celulares**

Os pacientes foram submetidos à contagem das células CD34<sup>+</sup> periféricas e realização de hemograma completo durante todo o período da mobilização, imediatamente pré-procedimento de leucaférese e nos dias subsequentes ao término das coletas.

As contagens celulares e plaquetárias foram realizadas por analisador hematológico automático ABBOTT- Cell-Dyn, modelo 1700 ( Unipath, Mountain View Ca- USA).

A quantificação das células CD34<sup>+</sup> foi determinada por citometria de fluxo, como descrita por SUTHERLAND et al (1994)(SUTHERLAND et al., 1994). As amostras do paciente e do produto foram diluídas para obtenção de  $5 \times 10^6$  células e incubadas em tubos Falcon contendo os anticorpos monoclonais específicos, durante 30 minutos em câmara escura. A marcação ocorreu adicionando-se anticorpo monoclonal CD14 conjugado a FITC (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA), simultaneamente com o anticorpo controle IG1 conjugado a PE (Becton & Dickinson). No tubo CD34 adicionou-se anticorpo monoclonal CD14/FITC e o anticorpo monoclonal CD34 HPCA2/PE. Após a incubação, foi adicionada solução tampão lisante de células vermelhas em cada tubo e deixadas à temperatura ambiente por quinze minutos, sendo lavadas duas vezes com tampão PBS em centrífuga Beckman (Palo Alto, CA, USA) a 1800 rpm por dez minutos. As células foram ressuspensas em solução tampão PBS e analisadas no citômetro de fluxo modelo FACscalibur (Becton & Dickinson). A compensação do aparelho foi realizada com *calibration beads* (Becton & Dickinson) e os dados foram coletados utilizando-se parâmetros de dispersão frontal (forward scatter - FSC) em escala linear, dispersão 90 graus

(side scatter - SSC), também em escala linear e fluorescência FL-1/FITC e FL-2/PE em escala logarítmica.

### **III.8. Parâmetros Estudados**

Foram analisados os seguintes parâmetros para todos os pacientes: idade, sexo, diagnóstico da doença de base, número de linhas quimioterápicas prévias à mobilização, radioterapia prévia, contagem de leucócitos totais no sangue periférico antes da mobilização (D0), dia dos granulócitos menor que  $1.0 \times 10^9/L$  após a quimioterapia, gramas de ciclofosfamida, dia do nadir, dia quando os leucócitos atingiram  $> 1.0 \times 10^9/L$ , após o nadir.

Para os 54 casos com o critério dois, além dos parâmetros citados anteriormente, consideramos também a quantificação de CD34 no sangue periférico com interpolação do dia com número máximo de CD34, o número de dias entre o dia do critério dois e o dia do nadir.

### **III.9. Análise Estatística**

Todos os dados de resultados foram analisados utilizando-se métodos descritivos, com tabelas de frequência e medidas de posição e dispersão.

Para todos os casos, foi usado o teste de correlação de Pearson nas variáveis: diagnóstico, sexo, gramas de Ciclofosfamida, número de linhas quimioterápicas prévias, radioterapia prévia e o hemograma no dia 0 da mobilização.

Foi utilizado Kruskal-Wallis para comparar as variáveis entre os três grupos de doença de base devido à falta da homogeneidade das variâncias entre estes 3 grupos (teste “post-hoc”Duncan)

Foi aplicada a regressão múltipla linear (stepwise backward procedure) para o cálculo de um modelo para prever o melhor dia da coleta, baseado nos critérios um e dois de início da leucoaférese.

Para os 54 casos analisados prospectivamente, foi estudada a evolução do número das células CD34+ do sangue periférico e obtido o dia do pico teórico da curva através de interpolação, usando regressão polinomial de 2º ou 3º grau, com "curve fitting".

O dia ideal da coleta foi definido como ponto quando a 1ª derivada de  $y = 0$ .

Todos os cálculos foram realizados com software comercialmente disponível Winstat, versão 3.1.

O nível de significância estatística adotado foi de 5%.

## ***IV. Resultados***

---

## IV.1. Características dos Pacientes

Foram incluídos no estudo, 134 pacientes que realizaram mobilização no período entre Janeiro de 1998 a Novembro de 2003. Todos estes pacientes seguiram os critérios de inclusão previamente estabelecidos. A tabela 1 resume as principais características dos pacientes.

Setenta e seis (56%) pacientes eram do sexo masculino e cinquenta e oito (43%), do sexo feminino. A mediana de idade de todos os pacientes foi de 39,5 anos (12-63). Os pacientes com Doença de Hodgkin formaram o grupo mais jovem, e os com mieloma múltiplo o mais velho. Todos os pacientes com LNH e DH estavam em fase de doença avançada (recaída / doença refratária) após terem realizado pelo menos uma ou duas linhas quimioterápicas convencionais de tratamento (tabela 1). Os pacientes com LNH receberam uma mediana de uma linha quimioterápica previamente à quimioterapia de altas doses (1-3), os pacientes com doença de Hodgkin receberam uma mediana de duas linhas quimioterápicas (1-4) e os pacientes com mieloma múltiplo, uma linha quimioterápica antes da quimioterapia de mobilização. Os portadores de LNH receberam CHOP, F-MACHOP (O'REILLY et al., 1991), VACOP-B e DHAP (VELASQUEZ et al., 1988). Em DH, as linhas quimioterápicas foram: MOPP, MOPP-ABVD. Vinte e oito pacientes (21%) receberam radioterapia prévia à mobilização.

Os dados do hemograma antes da quimioterapia de mobilização estão na tabela 2. Antes de iniciar a quimioterapia de altas doses para a mobilização, a maioria dos pacientes apresentaram os valores de leucócitos totais e granulócitos dentro da normalidade (tabela 2). No entanto, vinte e três pacientes apresentaram a contagem de leucócitos totais  $< 4 \times 10^9/L$  e sete pacientes com granulócitos  $< 1.5 \times 10^9/L$ .

**TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES**

| <b>Doença</b>                  | <b>Total</b> | <b>Linfoma Não-Hodgkin</b> | <b>Doença de Hodgkin</b> | <b>Mieloma Múltiplo</b> | <b>p</b> |
|--------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|----------|
| Nº pacientes                   | 134          | 65                         | 36                       | 33                      |          |
| Idade (mediana)                | 39.5 (12-63) | 42.0 (18-61)               | 26 (12-63)               | 48(28-62)               | P=0.01   |
| Masculino/ Feminino            | 76/58        | 41/24                      | 22/14                    | 13/10                   |          |
| Linhas quimioterápicas prévias | 1 (1-4)      | 1 (1-3)                    | 2 (1-4)                  | 1 (1-2)                 | P=0.05   |
| Estadiamento I e II            | 33 (24%)     |                            |                          |                         |          |
| III                            | 47 (35%)     |                            |                          |                         |          |
| IV                             | 54 (40%)     |                            |                          |                         |          |

**TABELA 2: PARÂMETROS DO HEMOGRAMA DO SANGUE PERIFÉRICO ANTES DA MOBILIZAÇÃO (D0)**

| <b>Doença</b>                       | <b>Linfoma Não-Hodgkin</b> | <b>Doença de Hodgkin</b> | <b>Mieloma múltiplo</b> |
|-------------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| N. pacientes                        | 65                         | 36                       | 33                      |
| Leucócitos D0 ( $\times 10^9/L$ )   | 6.1 (1.8-17,9)             | 5.60(1.9-12.3)           | 5.2 (2.19-10.1)         |
| Granulócitos D0 ( $\times 10^9/L$ ) | 4.2 (1.0-12.3)             | 4.1 (0.6-9.74)           | 3.18 (1.6-8.5)          |
| Hemoglobina D0 (g/dl)               | 11.9 (6.9-15.5)            | 11 (6.8-14.5)            | 10.9 (7.9-14.2)         |
| Plaquetas D0 ( $\times 10^9/L$ )    | 178 (56-534)               | 178 (32-675)             | 193 (83-344)            |

## IV.2. Mobilização e coleta de CPP

O resumo dos dados dos regimes de mobilização utilizados é mostrado na tabela 3. Todos os pacientes foram mobilizados utilizando quimioterapia e fator de crescimento (G-CSF). A maioria dos pacientes, 107/134 (79%), recebeu a dose de CY  $7g/m^2$ . Os pacientes que receberam CY  $4g/m^2$  foram aqueles que apresentavam antes da mobilização algum nível de restrição, seja ela cardíaca ou pulmonar, ou ainda, que não conseguiram realizar o

ecocardiograma previamente ao regime de mobilização adotado. Uma mediana de dois (1-8) procedimentos de leucoaférese foi realizada. A coleta das células progenitoras periféricas (CPPH) foi satisfatória em 82% dos casos (110/134), considerando células CD34+ coletadas  $> 5 \times 10^6/\text{Kg}$ .

Não foi encontrada correlação significativa entre a quantidade de células CD34+ coletadas e os valores do hemograma no D0 da quimioterapia. No entanto, encontramos correlação significativa e inversa para o dia do nadir ( $r = -0.19$ ;  $p = 0.01$ ) e para o dia dos leucócitos  $> 1.0 \times 10^9/\text{L}$  ( $r = -0.27$ ;  $p < 0.0001$ ). Os pacientes receberam diferentes números de linhas quimioterápicas prévias à CY e a mediana encontrada do dia do nadir e a mediana do dia da coleta não foi significativamente diferente entre os três grupos de doenças analisadas (tabela 3).

**TABELA 3: PARÂMETROS DA MOBILIZAÇÃO**

| <b>Doença</b>                                                          | <b>Linfoma<br/>Não-Hodgkin</b> | <b>Doença<br/>Hodgkin</b> | <b>de Mieloma<br/>Múltiplo</b> | <b>P</b>             |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Dia granulócitos $< 1.0 \times 10^9/\text{L}$                          | 6 (4-8)                        | 6 (4-7)                   | 6 (4-8)                        | $p=0.74(\text{NS})$  |
| Dia do Nadir                                                           | 9 (6-13)                       | 8 (5-14)                  | 9 (7-11)                       | $p=0.15(\text{NS})$  |
| Dia de leucócitos $> 1.0 \times 10^9/\text{L}$                         | 12 (8-19)                      | 12 (7-25)                 | 13 (9-19)                      |                      |
| Dia da Coleta                                                          | 13 (9-19)                      | 14 (8-25)                 | 14 (11-21)                     | $p=0.34(\text{NS})$  |
| Delta (dia do nadir – dia de granulócitos $< 1 \times 10^9/\text{L}$ ) | 3 (1-7)                        | 3 (0-8)                   | 3 (1-6)                        | $p=0.30 (\text{NS})$ |
| Células CD34+ coletadas ( $\times 10^6/\text{Kg}$ )                    | 6.9(0.87-38.2)                 | 6.1(0.48-29.2)            | 9.26(4.56-78)                  | $p=0.018$            |
| Ciclofosfamida                                                         |                                |                           |                                |                      |
| 4g/m <sup>2</sup> 27                                                   | 18                             | 6                         | 3                              |                      |
| 7g/m <sup>2</sup> 107                                                  | 47                             | 30                        | 30                             |                      |
| n° aféreses (média)                                                    | 2.2                            | 3.3                       | 1.8                            | $p<0.001$            |

Analisando a influência das variáveis dicotômicas, encontramos que os pacientes que receberam CY na dose de 4 g/m<sup>2</sup> obtiveram em média a coleta mais precoce: dia 11 pós mobilização; enquanto que os pacientes que receberam CY 7g/m<sup>2</sup>, a coleta ocorreu em

média no dia 13 pós mobilização, havendo diferença estatística entre estes dois grupos ( $p=0.002$ ). O mesmo ocorreu quando analisamos os grupos homens e mulheres, os homens coletaram em média no dia 12 e as mulheres no dia 13 pós-mobilização, com diferença estatística entre estes grupos ( $p=0.01$ ). A radioterapia prévia não influenciou significativamente no dia da coleta ( $p=0.37$ ).

Em relação ao dia dos leucócitos  $> 1.0 \times 10^9/L$ , encontramos significativa correlação direta entre este e dia do nadir ( $r=0.61$ ;  $p<0.0001$ ), correlação inversa com hemoglobina do dia 0 ( $r=-0.24$ ;  $p=0.004$ ) e dia dos granulócitos  $< 1.0 \times 10^9/L$  ( $r=-0.21$ ;  $p=0.005$ ).

Foi, então, aplicada a regressão múltipla com as variáveis significativas e encontramos a seguinte equação:

$$\text{Dia leucócitos} > 1.0 \times 10^9/L = (0.6 \times n. \text{ linhas quimioterápicas prévias}) + (1.2 \times \text{dia do nadir}) - (\text{dia granulócitos} < 1.0 \times 10^9/L \times 1.01) + (0.3 \times \text{gr CY}) + 5.3$$

Nesta equação, a variável dia de granulócitos sempre se manteve negativa em relação ao dia da coleta e o dia do nadir sempre se manteve positiva em relação ao dia da coleta.

Para simplificar o modelo, optamos por criar uma nova variável, a qual denominamos de *DELTA* que pode ser definida como a diferença de dias entre o dia do nadir e o dia de granulócitos  $< 1.0 \times 10^9/L$ .

Desta maneira, utilizando-se o *DELTA*, a equação obtida:

$$\text{Dia leucócitos} > 1.0 \times 10^9/L = (0.6 \times n. \text{ linhas quimioterápicas prévias}) + 1.2 \times \text{DELTA} + (0.3 \times \text{gr CY}) + 6.6.$$

Este modelo pôde explicar 50% da variância do dia da coleta ( $R^2=0.50$ ).

Em seguida, realizamos a mesma análise para cada grupo de doenças e obtivemos os seguintes modelos: para doença de Hodgkin, o dia da aférese =  $\text{delta} \times 1.52 + 6.8$ .

Para Linfoma Não-Hodgkin, o dia da aférese =  $\text{delta} \times 0.88 + 10.1$ .

Para os pacientes com Mieloma múltiplo, o dia da aférese =  $\text{delta} \times 1.35 + 8.8$ .

A mesma análise foi realizada com os 54 pacientes que tiveram o seu dia da coleta baseado no critério dois, conforme mencionado, ou seja, número de leucócitos  $> 1.0 \times 10^9/L$  e contagem de células CD34+ no sangue periférico  $> 10/\mu L$ .

Os pacientes que foram mobilizados com CY 4 g/m<sup>2</sup> obtiveram uma média de 11 dias após a quimioterapia para coletar CPPH, enquanto os pacientes que utilizaram CY 7g/m<sup>2</sup>, tiveram uma média de 13 dias para a coleta, com diferença significativa entre estes dois grupos (p = 0.002). Analisando em relação ao sexo, os homens coletaram mais precocemente que as mulheres (dia 11 os homens e dia 13 as mulheres), com diferença significativa entre os grupos (p = 0.01). Para este grupo de pacientes, a radioterapia não apresentou correlação significativa com o dia da coleta (p = 0.37).

A correlação de Pearson aplicada para estes pacientes foi significativa e inversa para a hemoglobina no dia 0 da quimioterapia ( r = - 0.40 ; p = 0.001), significativa e direta para dia dos granulócitos < 1.0 x 10<sup>9</sup>/L ( r = 0.67; p < 0.0001) , para a variável *DELTA* ( r = 0.67, p < 0.0001) e para o dia do nadir ( r = 0.56 , p < 0.0001).

Novamente, aplicamos a regressão múltipla e o modelo encontrado para este grupo de pacientes foi:

$$\text{Dia CD34+} > 10 / \mu\text{L} = ( 0.97 \times \text{DELTA} ) - ( \text{Hemoglobina D0} \times 0.24 ) + 12.8.$$

Este modelo explicou 53% da variância do dia da coleta (R<sup>2</sup>=0.53).

Realizamos a mesma análise para cada grupo de doenças e obtivemos os seguintes modelos: para doença de Hodgkin, o dia da aférese = *delta* x 1.5 + 9.1.

Para Linfoma Não-Hodgkin, o dia da aférese = *delta* x 0.6 + 10.8.

Para os pacientes com Mieloma múltiplo, o dia da aférese = *delta* x 1.6 + 8.8.

### **IV.3. Evolução da quantidade de células CD34+ no sangue periférico e a otimização da coleta.**

Analisando os 54 casos separadamente, e caso a caso, tentamos observar a dinâmica da mobilização juntamente com a quantificação das células CD34+ no sangue periférico. Esta quantificação foi iniciada no dia em que os leucócitos atingiram 1 x 10<sup>9</sup>/L após o nadir. Foram também quantificados nos dias subseqüentes à(s) leucoaférese (s), num total de três amostras em dias alternados.

Destes 54 pacientes, sete não conseguiram mobilizar e coletar número de CPPH adequado, ou seja, o total de células CD34+ não atingiu o valor de  $5 \times 10^6$ /Kg do paciente. Nestes sete doentes, o diagnóstico de doença de base foi de Linfoma Não-Hodgkin. Entre eles quatro já tinham recebido duas linhas quimioterápicas antes da mobilização, um já tinha recebido três linhas quimioterápicas prévias e dois pacientes uma linha quimioterápica. Em dois pacientes realizamos CY 4 g/m<sup>2</sup> devido alteração da função cardíaca.

Dos 54 pacientes, pudemos notar também que em apenas 16 (30%) a quantificação de células CD34 no sangue periférico foi realizada exatamente quando os leucócitos atingiram o valor de  $1 \times 10^9$ /L, conforme proposto no critério dois. Trinta e oito pacientes (70%) realizaram a quantificação de células CD34+ no sangue periférico nos dias subsequentes ao dia quando os leucócitos atingiram  $1 \times 10^9$ /L. Destes, 26 (68%) quantificaram CD34 um dia após os leucócitos  $> 1 \times 10^9$ /L; 10 (26%) pacientes dois dias após, 1 (2%) paciente três dias e 1 (2%) paciente quatro dias após os leucócitos estarem  $> 1 \times 10^9$ /L.

Todos os 47 pacientes que coletaram satisfatoriamente acabaram monitorando o valor do CD34+ periférico após a coleta de CPPH e analisando o comportamento destes valores de CD34+, nos deparamos com três situações distintas. Observamos que em 15 casos (31%), a leucoaférese ocorreu exatamente no dia do maior valor do CD34 periférico e após a coleta os valores de CD34 decresceram, dando origem a uma *curva descendente* (Figura 3). Em 5 pacientes (10%), o valor máximo de CD34 ocorreu após a coleta de CPPH, originando uma *curva ascendente* (Figura 4) e em 27 pacientes (57%) os pacientes realizaram o procedimento de leucoaférese numa fase precoce onde o valor de CD34 periférico estava aumentando progressivamente, atingiu o seu pico máximo e depois diminuiu, originando uma *curva parabólica* (Figura 5). Segue figuras ilustrativas dos três padrões de curva encontrados.

Separando os pacientes segundo o tipo de curva apresentada, reparamos que entre os pacientes do grupo de curva descendente, 14/15 (93%) necessitaram de apenas uma leucoaférese para se obter uma coleta de CPPH satisfatória ( $> 5 \times 10^6$  células/Kg). No grupo de curva ascendente, 3(60%) realizaram apenas 1 leucoaférese e o restante necessitou de 2 coletas. No grupo dos pacientes com curva parabólica, observamos que 14/27 (51%)

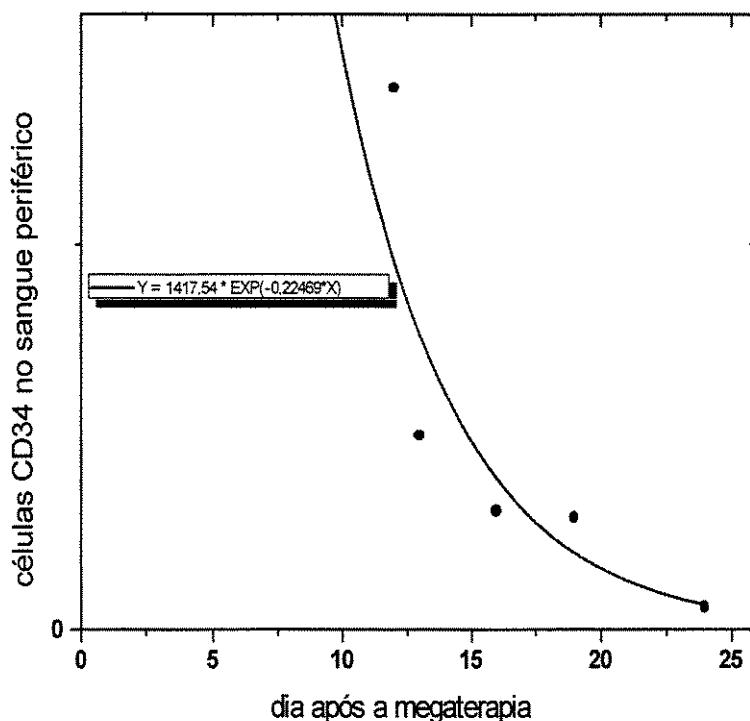
necessitaram de 1 leucoaférese, 9 (33%) de 2 leucoaféreses e 4 (14%) de 3 ou mais leucoaféreses para se obter  $> 5 \times 10^6$  células/Kg.

Para estes pacientes consideramos as variáveis: hemograma D0, idade, linhas quimioterápicas prévias, *DELTA*, dia do critério dois, dia quando CD34+ no sangue periférico atingiu o máximo interpolado a partir das contagens sequenciais realizadas e aplicamos a regressão linear múltipla na tentativa de se criar um modelo para a previsão do dia do pico máximo de CD34 para o início da coleta de CPPH.

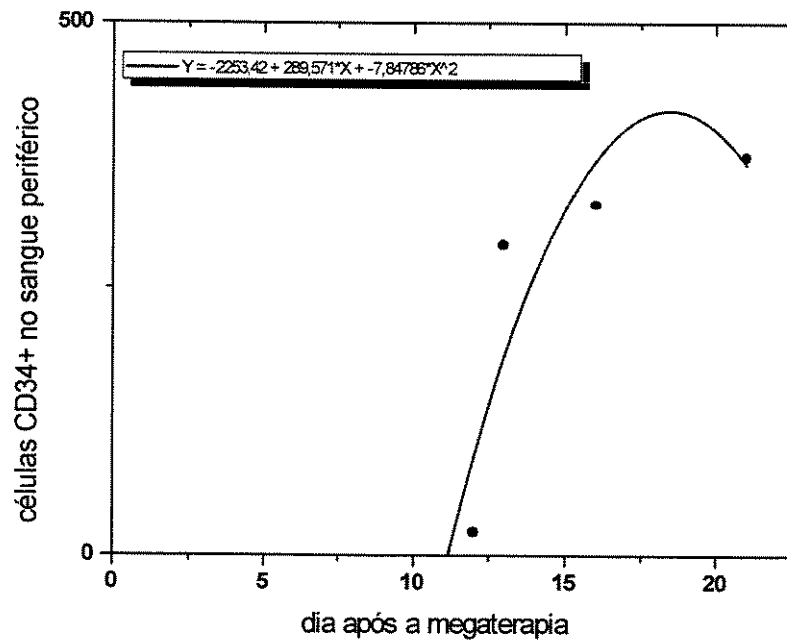
O modelo encontrado para este grupo de pacientes foi:

$$\text{Dia ideal da coleta} = [(-0.41) \times \text{Hb D0}] + [\text{dia CD34} > 10\mu\text{L e leucócitos} > 1 \times 10^9/\text{L} \times 0.99] + 7.8$$

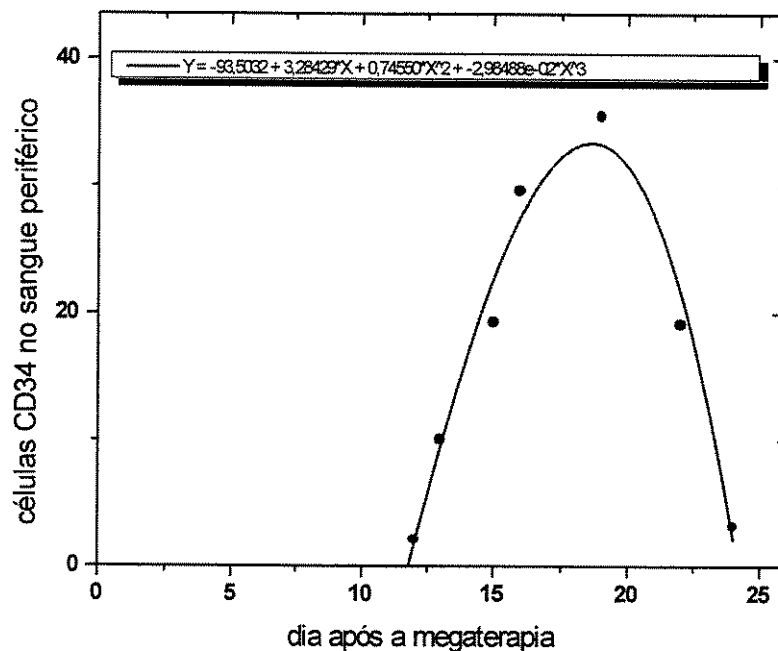
Este modelo explicou 80% da variação do dia da coleta ( $R^2=0.81$ ).



**Figura 3:** Regressão polinomial para a pesquisa do dia ideal teórico para coleta de CPPH. No caso, a determinação sequencial de CD34 no sangue periférico mostrou uma curva descendente (caso 29). O paciente iniciou a coleta no dia 12, fez 1 aférese e coletou um total de 8,94 células / Kg de peso.



**Figura 4:** Regressão polinomial para a pesquisa do dia ideal teórico para coleta de CPPH. No caso, a determinação sequencial de CD34 no sangue periférico mostrou uma curva ascendente (caso 25). O paciente iniciou a coleta no dia 13, fez 1 aférese e coletou um total de 23,3 células / Kg de peso.



**Figura 5:** Regressão polinomial para a pesquisa do dia ideal teórico para coleta de CPPH. No caso, a determinação sequencial de CD34 no sangue periférico mostrou uma curva parabólica (caso 12). O paciente iniciou a coleta no dia 12, fez 3 aférese e coletou um total de 6,74 células / Kg de peso.

Encontramos também um modelo que não necessita da quantificação de células CD34+ no sangue periférico. Através da regressão múltipla, pudemos prever o dia ideal interpolado, correspondendo ao dia do pico de células CD34+ no sangue periférico. Obtivemos assim a equação:

$$\text{Dia máximo interpolado de CD34+} = \text{delta} \times 1.41 + (\text{dia leucócitos} > 1 \times 10^9/\text{L} - \text{dia do nadir}) \times 0.95 + 8.3$$

Este modelo explicou, no entanto, 65% da variação do dia da coleta ( $R^2=0.65$ ).

## ***V. Discussão***

---

Este estudo foi elaborado com a proposta de resgatar, numa primeira fase, informações clínicas e laboratoriais de pacientes acompanhados em nosso Serviço, portadores de doenças onco-hematológicas, que tiveram indicação para a realização de quimioterapia de altas doses para coleta de CPPH para transplante autólogo. Estes pacientes já apresentavam doença em progressão e/ou refratariedade ao tratamento quimioterápico convencional.

O ponto central do nosso trabalho foi acompanhar o processo da mobilização e coleta de CPPH destes pacientes e tentar definir algumas situações, no que diz respeito ao melhor momento para ocorrer a coleta de CPPH, vivenciadas em nossa prática clínica diária.

Uma importante questão no manejo destes pacientes é predizer qual o melhor dia para a realização da aférese a fim de estabelecer parâmetros para que os procedimentos de leucaféreses fiquem cada vez mais seguros e eficazes (FORD et al., 1998),(CORSO et al., 2000; VANTELON et al., 2000; YU et al., 1999).

Para este grupo de pacientes, nós tentamos identificar quais os possíveis fatores que poderiam influenciar no processo da mobilização e coleta de CPPH.

Analizamos, então, vários parâmetros, dentre eles o número de linhas quimioterápicas prévias, a idade, sexo, a doença de base, radioterapia prévia, o hemograma antes da mobilização e sua evolução durante a fase aplásica e recuperação.

A influência da idade têm sido avaliada em alguns estudos com resultados contraditórios. Em nosso estudo, a idade não apresentou nenhuma influência no processo da mobilização. Morris *et al*(2003)(MORRIS et al., 2003) demonstraram que a mobilização em pacientes portadores de mieloma múltiplo com idade superior a 70 anos foi adequada, satisfatória e tolerada em 92% dos casos. Em nosso estudo, os pacientes apresentaram idade inferior a 63 anos. Portanto, não era de se esperar que a idade influenciasse neste procedimento, já que todos os pacientes deveriam ter reserva medular adequada, desde que não lesada por quimioterapia prévia.

Estudos demonstram também a radioterapia como fator negativo e adverso à coleta de CPPH (DEMIRER et al., 1996b; GOLDSCHMIDT et al., 1997). Nosso estudo não

confirmou este achado, talvez pelo pequeno número de pacientes que foram submetidos à radioterapia prévia à mobilização.

Na prática clínica, uma importante preocupação é a identificação de pacientes que tendem a falhar na mobilização. Perea *et al*, 2001(PEREA et al., 2001), descreveu que a falha da mobilização ocorre mais frequentemente com as mulheres. Nossa análise demonstrou que a coleta de CPPH ocorre mais precoce nos homens.

Em relação à doença de base, alguns estudos sugerem que a doença de base não influencia na dinâmica da mobilização (KOUMAKIS et al., 1996). No entanto, nós encontramos uma diferença entre os três grupos analisados. A coleta de CPPH ocorreu mais precocemente em pacientes com mieloma múltiplo do que nos pacientes portadores de linfomas.

No nosso Serviço estamos indicando mobilização e coleta de CPPH precocemente nos pacientes com LNH que não entraram em remissão ou que progrediram após a primeira linha de tratamento quimioterápico. No entanto, os pacientes com Doença de Hodgkin que progridem ou não atingem a remissão com a primeira linha quimioterápica, invariavelmente são submetidos a uma segunda linha quimioterápica e posteriormente à mobilização e coleta de CPPH, por isso, acabam formando o grupo de pacientes com maior número de linhas quimioterápicas pré-mobilização.

Nós comprovamos a capacidade mobilizante da ciclofosfamida em altas doses acompanhada de fator de crescimento e, tanto CY 4g/m<sup>2</sup> como CY 7g/m<sup>2</sup>, foram suficientes para mobilizar células progenitoras para o sangue periférico. Em relação à quantidade de CY utilizada, em nosso estudo, os pacientes mobilizados com CY 4g/m<sup>2</sup> coletaram mais precocemente que pacientes com CY 7g/m<sup>2</sup>, com diferença estatística significativa entre estes os dois grupos. A literatura mostra que a capacidade mobilizante de CY 4 g/m<sup>2</sup> é comparável com CY 7g/m<sup>2</sup> (GOLDSCHMIDT et al., 1997), porém existe menor toxicidade quando se utiliza CY 4g/m<sup>2</sup>.

Marques *et al* (2000)(MARQUES et al., 2000) demonstraram que o uso de CY 4 g/m<sup>2</sup> está relacionada com a recuperação leucocitária mais precoce, e este resultado, mostrou ser importante preditor de um número reduzido de procedimentos de leucaféreses, para se coletar a quantidade desejada de células CD34+.

No nosso estudo, a maioria dos pacientes obteve uma coleta satisfatória de células CD34+, em uma mediana de dois procedimentos de leucaférese por paciente usando CY 7g/m<sup>2</sup>.

Quando analisados separadamente, os pacientes com LNH coletaram uma mediana de  $6.1 \times 10^6$  células/Kg, os pacientes com LH uma mediana de  $6.1 \times 10^6$ /Kg e os pacientes com MM uma mediana de  $9.26 \times 10^6$  células/Kg. De uma certa forma, isto nos demonstra que nossos parâmetros de coleta de CPPH e equipamentos utilizados são efetivos.

Numa segunda fase de nosso trabalho, pudemos acompanhar, prospectivamente, 54 pacientes que foram submetidos à mobilização e coleta de CPPH. Para estes pacientes, a quantificação de CD34 periférico foi realizada quando os leucócitos atingiram  $1.0 \times 10^9$ /L e foi realizado o monitoramento do CD34+ periférico após a coleta de CPPH, nos dias subseqüentes.

Para estes pacientes, demonstramos que aqueles que foram para aférese exatamente no dia do pico CD34 periférico coletaram CPPH com apenas um procedimento de leucoaférese e a quantidade coletada foi extremamente satisfatória. Isto ocorreu em 93% que se encaixaram neste grupo. No entanto, o grupo de pacientes que foi para a leucoaférese precocemente, ou seja, numa fase em que o pico de CD34 ainda não havia ocorrido, tiveram uma coleta satisfatória com um procedimento de aférese em apenas 51% dos casos. O restante dos pacientes deste grupo necessitaram de dois a três procedimentos para obter uma quantidade adequada de CPPH. Estes resultados colaboram com a necessidade que temos na prática clínica em tentar indicar a leucaférese no melhor momento da recuperação da mobilização e se possível, no dia do pico máximo de CD34+ no sangue periférico.

Vários autores têm tentado identificar fatores que possam predizer a coleta de CPPH baseado nos valores do hemograma. Corso *et al* (2000)(CORSO et al., 2000) demonstraram em um estudo com pacientes portadores de mieloma múltiplo, que a contagem baixa de leucócitos totais e plaquetas do sangue periférico, exposição prévia ao melfalan e o intervalo entre a primeira quimioterapia maior que seis meses são fatores preditores para obtenção de coleta insuficiente de CD34+. Ketterer *et al* (1998)(KETTERER et al., 1998) relataram em seu estudo com pacientes onco-hematológicos que, contagens plaquetárias no

sangue periférico com valores superiores a  $150 \times 10^9/L$  estão relacionadas com uma coleta satisfatória de CPPH.

Em nosso estudo, a dinâmica da mobilização estudada foi um dos parâmetros importantes para estabelecer o dia ideal da coleta de CPPH. Quando analisamos o dia quando granulócitos  $< 1.0 \times 10^9/L$  e o dia do nadir, encontramos que quanto menor este intervalo de dias, mais cedo ocorre a recuperação leucocitária e a coleta de CPPH. Seguindo este raciocínio, devemos considerar que esta dinâmica de mobilização ocorre de maneira individual e própria para cada paciente e para cada doença de base.

Desta forma, a criação de modelos matemáticos podem nos servir como guias para definirmos o dia ideal da coleta de CPPH e assim, submeter os pacientes a um menor número de procedimentos de leucaféreses e diminuir os custos inerentes aos procedimentos envolvidos.

Recentemente, Obeyekere *et al* (2004)(OBEYESEKERE et al., 2004) desenvolveram um modelo matemático na tentativa de reproduzir a dinâmica do sistema hemopoiético juntamente com a dinâmica das células CD34+.

Nos modelos desenvolvidos em nosso estudo, a dosagem de CD34+ do sangue periférico não foi uma variável determinante, apesar de ser um parâmetro forte e quase que inquestionável para se indicar a coleta de CPPH. Nós utilizamos os valores do hemograma do sangue periférico e seu comportamento durante a mobilização e algumas características apresentadas pelos pacientes, ou seja, número de linhas quimioterápicas prévias e a doença de base. Os dois modelos finais criados não necessitam de muitos parâmetros para prever o dia do pico de CD34 no sangue periférico. No entanto, o modelo desenvolvido sem o dia  $CD34 = 10\mu/L$  no sangue periférico apresenta um poder preditor pior que o primeiro modelo desenvolvido.

Estes modelos matemáticos devem ser testados de modo prospectivo em outros centros transplantadores de medula óssea para serem convalidados na prática clínica e talvez, se tornem uma importante ferramenta de trabalho para a mobilização e coleta de CPPH dos pacientes onco-hematológicos.

## ***VI. Conclusões***

---

- A hemoglobina no dia 0, o número de linhas quimioterápicas prévias e o dia do nadir foram os parâmetros que mais influenciaram no processo de mobilização e coleta de CPPH.
- Contagens leucocitárias no sangue periférico antes da mobilização de CPPH e sua evolução durante a fase aplásica podem ser úteis para prever o início da coleta de CPPH por aféreses. A velocidade de queda dos neutrófilos após a mobilização é um parâmetro em comum a todos os pacientes
- O dia ideal da coleta pode ser previsto para cada doença, utilizando o *delta* de cada paciente, juntamente com as constantes e resíduo da patologia de base.
- Os modelos matemáticos criados na tentativa de prever o dia ideal da coleta de CPPH utilizaram os parâmetros do sangue periférico e sua evolução durante o processo de mobilização e puderam prever de 65 a 80% da variação do dia da coleta.

## ***VI. Referências Bibliográficas***

---

ABRAMSON, S.;MILLER, R.G.;PHILLIPS, R.A. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. **J Exp Med**, 145: 1567-79, 1977.

APPELBAUM, F.R.;HERZIG, G.P.;ZIEGLER, J.L.;GRAW, R.G.;LEVINE, A.S.;DEISSEROTH, A.B. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. **Blood**, 52: 85-95, 1978.

ARLAND, M.;LEUNER, S.;LANGE, S.;BARTSCH, R.;KAHL, C.;FLORSCHUTZ, A.;FRANKE, A.;HOFFKES, H.G. Ifosamide, epirubicin and granulocyte colony-stimulating factor: a regimen for successful mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with multiple myeloma. **Hematol Oncol**, 19: 59-66, 2001.

BELLUCCI, R.;DE PROPRIIS, M.S.;BUCCISANO, F.;LISCI, A.;LEONE, G.;TABILIO, A.;DE FABRITIIS, P. Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34+ cells during mobilization with G-CSF. **Bone Marrow Transplant**, 23: 1-8, 1999.

BENNETT, C.L.;ARMITAGE, J.L.;ARMITAGE, G.O.;VOSE, J.M.;BIERMAN, P.J.;ARMITAGE, J.O.;ANDERSON, J.R. Costs of care and outcomes for high-dose therapy and autologous transplantation for lymphoid malignancies: results from the University of Nebraska 1987 through 1991. **J Clin Oncol**, 13: 969-73, 1995.

BONSIGNORE, M.R.;MORICI, G.;SANTORO, A.;PAGANO, M.;CASCIO, L.;BONANNO, A.;ABATE, P.;MIRABELLA, F.;PROFITA, M.;INSALACO, G.;GIOIA, M.;VIGNOLA, A.M.;MAJOLINO, I.;TESTA, U.;HOGG, J.C. Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. **J Appl Physiol**, 93: 1691-7, 2002.

BURTNESS, B.A.;PSYRRI, A.;ROSE, M.;D'ANDREA, E.;STAUGAARD-HAHN, C.;HENDERSON-BAKAS, M.;CLARK, M.B.;MECHANIC, S.;KRAUSE, D.;SNYDER, E.;COOPER, R.B.;ABRANTES, J.;CORRINGHAM, R.;DEISSEROTH, A.;COOPER, D.L. A phase I study of paclitaxel for mobilization of peripheral blood progenitor cells. **Bone Marrow Transplant**, 23: 311-5, 1999.

- CARELLA, A.M.;FRASSONI, F. ICE, mini-ICE or high-dose hydroxyurea to mobilize Philadelphia (Ph1)-negative PBPC in chronic myelogenous leukaemia. **Br J Haematol**, 95: 213-5, 1996.
- CORSO, A.;CABERLON, S.;PAGNUCCO, G.;KLETSKY, C.;ZAPPASODI, P.;ALESSANDRINO, E.P.;VANELLI, L.;MANGIACAVALLI, S.;LAZZARINO, M.;BERNASCONI, C. Blood stem cell collections in multiple myeloma: definition of a scoring system. **Bone Marrow Transplant**, 26: 283-6, 2000.
- COTTLER-FOX, M.H.;LAPIDOT, T.;PETIT, I.;KOLLET, O.;DIPERSIO, J.F.;LINK, D.;DEVINE, S. Stem cell mobilization. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)**: 419-37, 2003.
- D'ARENA, G.;CASCAVILLA, N.;MUSTO, P.;GRECO, M.;DI MAURO, L.;CARELLA, A.M.;DELLO IACONO, N.;CAROTENUTO, M. Flow cytometric characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in mobilized peripheral blood and bone marrow of cancer patients. **Haematologica**, 81: 216-23, 1996.
- D'ARENA, G.;MUSTO, P.;CAROTENUTO, M. When to perform peripheral blood progenitor cell collection in hematological patients? **Haematologica**, 82: 124-5, 1997.
- D'ARENA, G.;MUSTO, P.;DI MAURO, L.;CASCAVILLA, N.;IACONO, N.D.;SCALZULLI, P.R.;MATERA, R.;CAROTENUTO, M. Predictive parameters for mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cell collection in patients with hematological malignancies. **Am J Hematol**, 58: 255-62, 1998.
- DEMIRER, T.;BUCKNER, C.D.;BENSINGER, W.I. Optimization of peripheral blood stem cell mobilization. **Stem Cells**, 14: 106-16, 1996a.
- DEMIRER, T.;BUCKNER, C.D.;GOOLEY, T.;APPELBAUM, F.R.;ROWLEY, S.;CHAUNCEY, T.;LILLEBY, K.;STORB, R.;BENSINGER, W.I. Factors influencing collection of peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma. **Bone Marrow Transplant**, 17: 937-41, 1996b.

- DEMIRER, T.;BUCKNER, C.D.;STORER, B.;LILLEBY, K.;ROWLEY, S.;CLIFT, R.;APPELBAUM, F.R.;STORB, R.;BENSINGER, W.I. Effect of different chemotherapy regimens on peripheral-blood stem-cell collections in patients with breast cancer receiving granulocyte colony-stimulating factor. **J Clin Oncol**, 15: 684-90, 1997.
- DREYFUS, F.;LEBLOND, V.;BELANGER, C.;GABARRE, J.;SUTTON, L.;BOCCACCIO, C.;QUARRE, M.C.;RIBRAG, V.;GOY, A. Peripheral blood stem cell collection and autografting in high risk lymphomas. **Bone Marrow Transplant**, 10: 409-13, 1992.
- DURIE, B.G.;SALMON, S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. **Cancer**, 36: 842-54, 1975.
- FIBBE, W.E.;PRUIJT, J.F.;VAN KOOYK, Y.;FIGDOR, C.G.;OPDENAKKER, G.;WILLEMZE, R. The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization. **Semin Hematol**, 37: 19-24, 2000.
- FISCHMEISTER, G.;KURZ, M.;HAAS, O.A.;MICKSCHE, M.;BUCHINGER, P.;PRINTZ, D.;RESSMANN, G.;STROEBEL, T.;PETERS, C.;FRITSCH, G.;GADNER, H. G-CSF versus GM-CSF for stimulation of peripheral blood progenitor cells (PBPC) and leukocytes in healthy volunteers: comparison of efficacy and tolerability. **Ann Hematol**, 78: 117-23, 1999.
- FORD, C.D.;PACE, N.;LEHMAN, C. Factors affecting the efficiency of collection of CD34-positive peripheral blood cells by a blood cell separator. **Transfusion**, 38: 1046-50, 1998.
- FRUEHAUF, S.;HAAS, R.;CONRADT, C.;MUREA, S.;WITT, B.;MOHLE, R.;HUNSTEIN, W. Peripheral blood progenitor cell (PBPC) counts during steady-state hematopoiesis allow to estimate the yield of mobilized PBPC after filgrastim (R-metHuG-CSF)-supported cytotoxic chemotherapy. **Blood**, 85: 2619-26, 1995.
- FU, S.;LIESVELD, J. Mobilization of hematopoietic stem cells. **Blood Rev**, 14: 205-18, 2000.
- GANDHI, M.K.;JESTICE, K.;SCOTT, M.A.;BLOXHAM, D.;BASS, G.;MARCUS, R.E. The minimum CD34 threshold depends on prior chemotherapy in autologous peripheral blood stem cell recipients. **Bone Marrow Transplant**, 23: 9-13, 1999.

GAZITT, Y.;FREYTES, C.O.;CALLANDER, N.; TSAI, T.W.;ALSINA, M.;ANDERSON, J.;HOLLE, L.;CRUZ, J.;DEVORE, P.;MCGRATH, M.;WEST, G.;ALVAREZ, R.;MONTGOMERY, W. Successful PBSC mobilization with high-dose G-CSF for patients failing a first round of mobilization. **J Hematother**, 8: 173-83, 1999.

GIANNI, A.M.;BREGNI, M.;SIENA, S.;MAGNI, M.;DI NICOLA, M.;LOMBARDI, F.;TARELLA, C.;PILERI, A.;BONADONNA, G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor infusion makes high-dose etoposide a safe outpatient regimen that is effective in lymphoma and myeloma patients. **J Clin Oncol**, 10: 1955-62, 1992.

GIANNI, A.M.;SIENA, S.;BREGNI, M.;TARELLA, C.;STERN, A.C.;PILERI, A.;BONADONNA, G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. **Lancet**, 2: 580-5, 1989.

GOLDSCHMIDT, H.;HEGENBART, U.;HAAS, R.;HUNSTEIN, W. Mobilization of peripheral blood progenitor cells with high-dose cyclophosphamide (4 or 7 g/m<sup>2</sup>) and granulocyte colony-stimulating factor in patients with multiple myeloma. **Bone Marrow Transplant**, 17: 691-7, 1996.

GOLDSCHMIDT, H.;HEGENBART, U.;WALLMEIER, M.;HOHAUS, S.;HAAS, R. Factors influencing collection of peripheral blood progenitor cells following high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor in patients with multiple myeloma. **Br J Haematol**, 98: 736-44, 1997.

HAAS, R.;MOHLE, R.;FRUHAUF, S.;GOLDSCHMIDT, H.;WITT, B.;FLENTJE, M.;WANNENMACHER, M.;HUNSTEIN, W. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. **Blood**, 83: 3787-94, 1994.

HANSSON, M.;SVENSSON, A.;ENGERVALL, P.;BJORKHOLM, M.;GRUBER, A.;SODERSTROM, T. Increase of monocytes predicts mobilization of peripheral stem and progenitor cells after chemotherapy followed by G-CSF administration. **Eur J Haematol**, 54: 321-8, 1995.

- HASEGAWA, M.;BALDWIN, T.M.;METCALF, D.;FOOTE, S.J. Progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor controlled by loci on chromosomes 2 and 11. **Blood**, 95: 1872-4, 2000.
- JAGANNATH, S.;VESOLE, D.H.;GLENN, L.;CROWLEY, J.;BARLOGIE, B. Low-risk intensive therapy for multiple myeloma with combined autologous bone marrow and blood stem cell support. **Blood**, 80: 1666-72, 1992.
- JANOWSKA-WIECZOREK, A.;MARQUEZ, L.A.;NABHOLTZ, J.M.;CABUHAT, M.L.;MONTANO, J.;CHANG, H.;ROZMUS, J.;RUSSELL, J.A.;EDWARDS, D.R.;TURNER, A.R. Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane. **Blood**, 93: 3379-90, 1999.
- JUTTNER, C.A.;TO, L.B.;HAYLOCK, D.N.;DYSON, P.G.;THORP, D.;DART, G.W.;HO, J.Q.;HORVATH, N.;BARDY, P. Autologous blood stem cell transplantation. **Transplant Proc**, 21: 2929-31, 1989.
- KANOLD, J.;BERGER, M.;HALLE, P.;RAPATEL, C.;SCHOEPFER, C.;DE LUMLEY, L.;VANNIER, J.P.;LUTZ, P.;PLANTAZ, D.;STEPHAN, J.L.;MALPUECH, G.;DEMEOCQ, F. Kinetics of hematopoietic progenitor cell release induced by G-CSF-alone in children with solid tumors and leukemias. **Bone Marrow Transplant**, 21: 59-63, 1998.
- KAWANO, Y.;WATANABE, T.;TAKAUE, Y. Mobilization/harvest and transplantation with blood stem cells, manipulated or unmanipulated. **Pediatr Transplant**, 3 Suppl 1: 65-71, 1999.
- KESSINGER, A.;ARMITAGE, J.O.;LANDMARK, J.D.;WEISENBURGER, D.D. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. **Exp Hematol**, 14: 192-6, 1986.
- KETTERER, N.;SALLES, G.;MOULLET, I.;DUMONTET, C.;ELJAAFARI-CORBIN, A.;TREMISI, P.;THIEBLEMONT, C.;DURAND, B.;NEIDHARDT-BERARD, E.M.;SAMAHA, H.;RIGAL, D.;COIFFIER, B. Factors associated with successful mobilization of peripheral blood progenitor cells in 200 patients with lymphoid malignancies. **Br J Haematol**, 103: 235-42, 1998.

- KOLBE, K.;PESCHEL, C.;RUPILIUS, B.;DESPRES, D.;BURGER, K.;SKLENAR, I.;FARBER, L.;HUBER, C.;DERIGS, H.G. Peripheral blood stem cell (PBSC) mobilization with chemotherapy followed by sequential IL-3 and G-CSF administration in extensively pretreated patients. **Bone Marrow Transplant**, 20: 1027-32, 1997.
- KORBLING, M.;ANDERLINI, P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? **Blood**, 98: 2900-8, 2001.
- KORBLING, M.;DORKEN, B.;HO, A.D.;PEZZUTTO, A.;HUNSTEIN, W.;FLIEDNER, T.M. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. **Blood**, 67: 529-32, 1986.
- KORBLING, M.;HUH, Y.O.;DURETT, A.;MIRZA, N.;MILLER, P.;ENGEL, H.;ANDERLINI, P.;VAN BESSEN, K.;ANDREEFF, M.;PRZEPIORKA, D. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. **Blood**, 86: 2842-8, 1995.
- KOTASEK, D.;SHEPHERD, K.M.;SAGE, R.E.;DALE, B.M.;NORMAN, J.E.;CHARLES, P.;GREGG, A.;PILLOW, A.;BOLTON, A. Factors affecting blood stem cell collections following high-dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. **Bone Marrow Transplant**, 9: 11-7, 1992.
- KOUMAKIS, G.;VASSILOMANOLAKIS, M.;HATZICHRISTOU, H.;BARBOUNIS, V.;FILIS, J.;PAPANASTASIOU, K.;MORAKI, M.;KRITSIOTI, M.;PLATANIOTIS, G.;STAMATELOU, M.;EFREMIDIS, A.P. Predictive factors affecting mobilization and peripheral blood stem cell (PBSC) collection using single apheresis (SA) for rescuing patients after high-dose chemotherapy (HD.CHE) in various malignancies. **Bone Marrow Transplant**, 18: 1065-72, 1996.
- KRIEGER, M.S.;SCHILLER, G.;BERENSON, J.R.;STEWART, K.;NOGA, S.J.;BALLESTER, O.;TARANTOLO, S.;STIFF, P.;KUHN, D.;SCHERZO, E.;SING, A.;JACOBS, C.;WHITE, J.M.;DIPERSIO, J. Collection of peripheral blood progenitor cells

(PBPC) based on a rising WBC and platelet count significantly increases the number of CD34+ cells. **Bone Marrow Transplant**, 24: 25-8, 1999.

KROGER, N.;ZELLER, W.;FEHSE, N.;HASSAN, H.T.;KRUGER, W.;GUTENSOHN, K.;LOLLIGER, C.;ZANDER, A.R. Mobilizing peripheral blood stem cells with high-dose G-CSF alone is as effective as with Dexamethasone-BEAM plus G-CSF in lymphoma patients. **Br J Haematol**, 102: 1101-6, 1998a.

KROGER, N.;ZELLER, W.;HASSAN, H.T.;DIERLAMM, J.;ZANDER, A.R. Difference between expression of adhesion molecules on CD34+ cells from bone marrow and G-CSF-stimulated peripheral blood. **Stem Cells**, 16: 49-53, 1998b.

KROGER, N.;ZELLER, W.;HASSAN, H.T.;KRUGER, W.;GUTENSOHN, K.;LOLLIGER, C.;ZANDER, A.R. Stem cell mobilization with G-CSF alone in breast cancer patients: higher progenitor cell yield by delivering divided doses (2 x 5 microg/kg) compared to a single dose (1 x 10 microg/kg). **Bone Marrow Transplant**, 23: 125-9, 1999.

KURATA, H.;TAKAKUWA, K.;TSUNEKI, I.;AOKI, Y.;TANAKA, K. Paclitaxel in combination with cisplatin is less effective for peripheral blood progenitor cell mobilization. **Int J Gynecol Cancer**, 10: 459-62, 2000.

KURNICK, N.B.;MONTANO, A.;GERDES, J.C.;FEDER, B.H. Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. **Ann Intern Med**, 49: 973-86, 1958.

LAPIDOT, T.;PETIT, I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. **Exp Hematol**, 30: 973-81, 2002.

LATAILLADE, J.J.;CLAY, D.;DUPUY, C.;RIGAL, S.;JASMIN, C.;BOURIN, P.;LE BOUSSE-KERDILES, M.C. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. **Blood**, 95: 756-68, 2000.

LEFRERE, F.;BERNARD, M.;AUDAT, F.;CAVAZZANA-CALVO, M.;BELANGER, C.;HERMINE, O.;ARNULF, B.;BUZYN, A.;VARET, B. Comparison of lenograstim vs filgrastim administration following chemotherapy for peripheral blood stem cell (PBSC) collection: a retrospective study of 126 patients. **Leuk Lymphoma**, 35: 501-5, 1999a.

LEFRERE, F.;MAKKE, J.;FERMAND, J.;MAROLLEAU, J.;DAL CORTIVO, L.;ALBERTI, C.;MOUTON, V.;BENBUNAN, M.;MICLEA, J. Blood stem cell collection using chemotherapy with or without systematic G-CSF: experience in 52 patients with multiple myeloma. **Bone Marrow Transplant**, 24: 463-6, 1999b.

LI, K.;WONG, A.;LI, C.K.;SHING, M.M.;CHIK, K.W.;TSANG, K.S.;LAI, H.;LEUNG, T.F.;YUEN, P.M. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells in beta-thalassemia patients: kinetics of mobilization and composition of apheresis product. **Exp Hematol**, 27: 526-32, 1999.

LIU, F.;POURSINE-LAURENT, J.;LINK, D.C. The granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for the mobilization of murine hematopoietic progenitors into peripheral blood by cyclophosphamide or interleukin-8 but not flt-3 ligand. **Blood**, 90: 2522-8, 1997.

MAJOLINO, I.;PEARCE, R.;TAGHIPOUR, G.;GOLDSTONE, A.H. Peripheral-blood stem-cell transplantation versus autologous bone marrow transplantation in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas: a new matched-pair analysis of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Registry Data. Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **J Clin Oncol**, 15: 509-17, 1997.

MARIT, G.;THIESSARD, F.;FABERES, C.;CONY-MAKHOUL, P.;BOIRON, J.M.;BERNARD, P.;PIGNEUX, A.;PUNTOUS, M.;AGAPE, P.;VEZON, G.;BROUSTET, A.;GIRAULT, D.;SALMI, L.R.;REIFFERS, J. Factors affecting both peripheral blood progenitor cell mobilization and hematopoietic recovery following autologous blood progenitor cell transplantation in multiple myeloma patients: a monocentric study. **Leukemia**, 12: 1447-56, 1998.

MARQUES, J.F.;VIGORITO, A.C.;ARANHA, F.J.;LORAND-METZE, I.;MIRANDA, E.C.;LIMA FILHO, E.C.;VALBONESI, M.;SANTINI, G.;DE SOUZA, C.A. Early total

white blood cell recovery is a predictor of low number of apheresis and good CD34(+) cell yield. **Transfus Sci**, 23: 91-100, 2000.

MCQUAKER, I.;HAYNES, A.;STAINER, C.;BYRNE, J.;RUSSELL, N. Mobilisation of peripheral blood stem cells with IVE and G-CSF improves CD34+ cell yields and engraftment in patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. **Bone Marrow Transplant**, 24: 715-22, 1999.

MIELCAREK, M.;TOROK-STORB, B. Phenotype and engraftment potential of cytokine-mobilized peripheral blood mononuclear cells. **Curr Opin Hematol**, 4: 176-82, 1997.

MILLS, W.;CHOPRA, R.;MCMILLAN, A.;PEARCE, R.;LINCH, D.C.;GOLDSTONE, A.H. BEAM chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, 13: 588-95, 1995.

MONCADA, V.;BOLAN, C.;YAU, Y.Y.;LEITMAN, S.F. Analysis of PBPC cell yields during large-volume leukapheresis of subjects with a poor mobilization response to filgrastim. **Transfusion**, 43: 495-501, 2003.

MORRIS, C.L.;SIEGEL, E.;BARLOGIE, B.;COTTLER-FOX, M.;LIN, P.;FASSAS, A.;ZANGARI, M.;ANAISSE, E.;TRICOT, G. Mobilization of CD34+ cells in elderly patients ( $\geq 70$  years) with multiple myeloma: influence of age, prior therapy, platelet count and mobilization regimen. **Br J Haematol**, 120: 413-23, 2003.

MOSKOWITZ, C.H.;GLASSMAN, J.R.;WUEST, D.;MASLAK, P.;REICH, L.;GUCCIARDO, A.;COADY-LYONS, N.;ZELENETZ, A.D.;NIMER, S.D. Factors affecting mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with lymphoma. **Clin Cancer Res**, 4: 311-6, 1998.

OBEYESEKERE, M.N.;BERRY, R.W.;SPICER, P.P.;KORBLING, M. A mathematical model of haemopoiesis as exemplified by CD34 cell mobilization into the peripheral blood. **Cell Prolif**, 37: 279-94, 2004.

O'REILLY, S.E.;HOSKINS, P.;KLIMO, P.;CONNORS, J.M. MACOP-B and VACOP-B in diffuse large cell lymphomas and MOPP/ABV in Hodgkin's disease. **Ann Oncol**, 2 Suppl 1: 17-23, 1991.

PASSOS-COELHO, J.L.;BRAINE, H.G.;DAVIS, J.M.;HUELSKAMP, A.M.;SCHEPERS, K.G.;OHLY, K.;CLARKE, B.;WRIGHT, S.K.;NOGA, S.J.;DAVIDSON, N.E. Predictive factors for peripheral-blood progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mobilization. **J Clin Oncol**, 13: 705-14, 1995.

PECORA, A.L. Impact of stem cell dose on hematopoietic recovery in autologous blood stem cell recipients. **Bone Marrow Transplant**, 23 Suppl 2: S7-12, 1999.

PEREA, G.;SUREDA, A.;MARTINO, R.;ALTES, A.;MARTINEZ, C.;CABEZUDO, E.;AMILL, B.;MARTIN-HENAO, G.A.;GONZALEZ, Y.;MUNOZ, L.;PEYRET, M.;BRUNET, S.;SIERRA, J. Predictive factors for a successful mobilization of peripheral blood CD34+ cells in multiple myeloma. **Ann Hematol**, 80: 592-7, 2001.

PEREY, L.;PETERS, R.;PAMPALLONA, S.;SCHNEIDER, P.;GROSS, N.;LEYVRAZ, S. Extensive phenotypic analysis of CD34 subsets in successive collections of mobilized peripheral blood progenitors. **Br J Haematol**, 103: 618-29, 1998.

PRUIJT, J.F.;FIBBE, W.E.;LATERVEER, L.;PIETERS, R.A.;LINDLEY, I.J.;PAEMEN, L.;MASURE, S.;WILLEMZE, R.;OPDENAKKER, G. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96: 10863-8, 1999.

REIFFERS, J.;BERNARD, P.;DAVID, B.;VEZON, G.;SARRAT, A.;MARIT, G.;MOULINIER, J.;BROUSTET, A. Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. **Exp Hematol**, 14: 312-5, 1986.

ROWLINGS, P.A.;BAYLY, J.L.;RAWLING, C.M.;JUTTNER, C.A.;TO, L.B. A comparison of peripheral blood stem cell mobilisation after chemotherapy with cyclophosphamide as a

single agent in doses of 4 g/m<sup>2</sup> or 7 g/m<sup>2</sup> in patients with advanced cancer. **Aust N Z J Med**, 22: 660-4, 1992.

SANTINI, G.;DE SOUZA, C.;CONGIU, A.M.;NATI, S.;MARINO, G.;SORACCO, M.;SERTOLI, M.R.;RUBAGOTTI, A.;SPRIANO, M.;VASSALLO, F.;ROSSI, E.;VIMERCATI, R.;PIAGGIO, G.;FIGARI, O.;BENVENUTO, F.;ABATE, M.;TRUINI, M.;RAVETTI, J.L.;RIBIZZI, I.;DAMASIO, E. High-dose cyclophosphamide followed by autografting can improve the outcome of relapsed or resistant non-Hodgkin's lymphomas with involved or hypoplastic bone marrow. **Leuk Lymphoma**, 33: 321-30, 1999.

SAUTOIS, B.;FRAIPONT, V.;BAUDOUX, E.;FASSOTTE, M.F.;HERMANNE, J.P.;JERUSALEM, G.;BOURS, V.;BOSQUEE, L.;SCHAAF-LAFONTAINE, N.;PAULUS, J.M.;SONDAG, D.;FILLET, G.;BEGUIN, Y. Peripheral blood progenitor cell collections in cancer patients: analysis of factors affecting the yields. **Haematologica**, 84: 342-9, 1999.

SCHWARTZBERG, L.S.;BIRCH, R.;HAZELTON, B.;TAUER, K.W.;LEE, P., JR.;ALTEMOSE, R.;GEORGE, C.;BLANCO, R.;WITTLIN, F.;COHEN, J.;ET AL. Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **J Hematother**, 1: 317-27, 1992.

SIENA, S.;BREGNI, M.;BRANDO, B.;BELLI, N.;LANSDORP, P.M.;BONADONNA, G.;GIANNI, M. Flow cytometry to estimate circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation: comparative analysis of different CD34 monoclonal antibodies. **Haematologica**, 76: 330-3, 1991.

SIENA, S.;BREGNI, M.;BRANDO, B.;RAVAGNANI, F.;BONADONNA, G.;GIANNI, A.M. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, 74: 1905-14, 1989.

SPITZER, G.;ADKINS, D.;MATHEWS, M.;VELASQUEZ, W.;BOWERS, C.;DUNPHY, F.;KRONMUELLER, N.;NIEMEYER, R.;MCINTYRE, W.;PETRUSKA, P. Randomized comparison of G-CSF + GM-CSF vs G-CSF alone for mobilization of peripheral blood stem

cells: effects on hematopoietic recovery after high-dose chemotherapy. **Bone Marrow Transplant**, 20: 921-30, 1997.

STEIN, R.S.;GREER, J.P.;GOODMAN, S.;BRANDT, S.J.;MORGAN, D.S.;MACON, W.R.;MCCURLEY, T.L.;WOLFF, S.N. Intensified preparative regimens and autologous transplantation in refractory or relapsed intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma. **Bone Marrow Transplant**, 25: 257-62, 2000.

SUREDA, A.;PETIT, J.;BRUNET, S.;BOQUE, C.;AVENTIN, A.;MARTINO, R.;GONZALEZ, J.R.;AMILL, B.;LARRIBA, I.;BLANCO, A.;MARTIN-HENAO, G.A.;SIERRA, J.;GRANENA, A. Mini-ICE regimen as mobilization therapy for chronic myelogenous leukaemia patients at diagnosis. **Bone Marrow Transplant**, 24: 1285-90, 1999.

SUTHERLAND, D.R.;KEATING, A.;NAYAR, R.;ANANIA, S.;STEWART, A.K. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. **Exp Hematol**, 22: 1003-10, 1994.

TARELLA, C.;FERRERO, D.;BREGNI, M.;SIENA, S.;GALLO, E.;PILERI, A.;GIANNI, A.M. Peripheral blood expansion of early progenitor cells after high-dose cyclophosphamide and rhGM-CSF. **Eur J Cancer**, 27: 22-7, 1991.

TO, L.B.;HAYLOCK, D.N.;KIMBER, R.J.;JUTTNER, C.A. High levels of circulating haemopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia and their collection and cryopreservation. **Br J Haematol**, 58: 399-410, 1984.

TO, L.B.;HAYLOCK, D.N.;SIMMONS, P.J.;JUTTNER, C.A. The biology and clinical uses of blood stem cells. **Blood**, 89: 2233-58, 1997.

TO, L.B.;ROBERTS, M.M.;HAYLOCK, D.N.;DYSON, P.G.;BRANFORD, A.L.;THORP, D.;HO, J.Q.;DART, G.W.;HORVATH, N.;DAVY, M.L. Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. **Bone Marrow Transplant**, 9: 277-84, 1992.

TRICOT, G.;JAGANNATH, S.;VESOLE, D.;NELSON, J.;TINDLE, S.;MILLER, L.;CHESON, B.;CROWLEY, J.;BARLOGIE, B. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. **Blood**, 85: 588-96, 1995.

UDOMSAKDI, C.;LANSDORP, P.M.;HOGGE, D.E.;REID, D.S.;EAVES, A.C.;EAVES, C.J. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. **Blood**, 80: 2513-21, 1992.

VANTELON, J.M.;KOSCIELNY, S.;BRAULT, P.;BOURHIS, J.H.;RIBRAG, V.;PICO, J.;FENAUX, P.;MUNCK, J.N. Scoring system for the prediction of successful peripheral blood stem cell (PBSC) collection in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): application in clinical practice. **Bone Marrow Transplant**, 25: 495-9, 2000.

VELASQUEZ, W.S.;CABANILLAS, F.;SALVADOR, P.;MCLAUGHLIN, P.;FRIDRIK, M.;TUCKER, S.;JAGANNATH, S.;HAGEMEISTER, F.B.;REDMAN, J.R.;SWAN, F. Effective salvage therapy for lymphoma with cisplatin in combination with high-dose Ara-C and dexamethasone (DHAP). **Blood**, 71: 117-22, 1988.

VIGORITO, A.C.;AZEVEDO, W.M.;MARQUES, J.F.;AZEVEDO, A.M.;EID, K.A.;ARANHA, F.J.;LORAND-METZE, I.;OLIVEIRA, G.B.;CORREA, M.E.;REIS, A.R.;MIRANDA, E.C.;DE SOUZA, C.A. A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. **Bone Marrow Transplant**, 22: 1145-51, 1998.

WATANABE, T.;DAVE, B.;HEIMANN, D.G.;LETHABY, E.;KESSINGER, A.;TALMADGE, J.E. GM-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cells differ from steady-state bone marrow CD34+ cells in adhesion molecule expression. **Bone Marrow Transplant**, 19: 1175-81, 1997.

WATANABE, T.;KAWANO, Y.;KANAMARU, S.;ONISHI, T.;KANEKO, S.;WAKATA, Y.;NAKAGAWA, R.;MAKIMOTO, A.;KURODA, Y.;TAKAUE, Y.;TALMADGE, J.E. Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. **Blood**, 93: 1157-63, 1999.

- WATTS, M.J.;SULLIVAN, A.M.;JAMIESON, E.;PEARCE, R.;FIELDING, A.;DEVEREUX, S.;GOLDSTONE, A.H.;LINCH, D.C. 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 Clin Oncol**, 15: 535-46, 1997.
- WEAVER, A.;TESTA, N.G. Stem cell factor leads to reduced blood processing during apheresis or the use of whole blood aliquots to support dose-intensive chemotherapy. **Bone Marrow Transplant**, 22: 33-8, 1998.
- WEAVER, C.H.;TAUER, K.;ZHEN, B.;SCHWARTZBERG, L.S.;HAZELTON, B.;WEAVER, Z.;LEWKOW, L.;ALLEN, C.;LONGIN, K.;BUCKNER, C.D. Second attempts at mobilization of peripheral blood stem cells in patients with initial low CD34+ cell yields. **J Hematother**, 7: 241-9, 1998.
- WHETTON, A.D.;GRAHAM, G.J. Homing and mobilization in the stem cell niche. **Trends Cell Biol**, 9: 233-8, 1999.
- WITT, V.;FISCHMEISTER, G.;SCHARNER, D.;PRINTZ, D.;POTTSCHEGER, U.;FRITSCH, G.;GADNER, H. Collection efficiencies of MNC subpopulations during autologous CD34+ peripheral blood progenitor cell (PBPC) harvests in small children and adolescents. **J Clin Apheresis**, 16: 161-8, 2001.
- YU, J.;LEISENRING, W.;BENSINGER, W.I.;HOLMBERG, L.A.;ROWLEY, S.D. The predictive value of white cell or CD34+ cell count in the peripheral blood for timing apheresis and maximizing yield. **Transfusion**, 39: 442-50, 1999.

## ***ANEXO I***

## Protocolo de tratamento para Cy (4 g/m<sup>2</sup>)

| Hora                 | Ciclofosfamida                          | Uromitexan           |
|----------------------|-----------------------------------------|----------------------|
| 0                    | Cy 1.0 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 1                    |                                         | 1.0 g / i.v. / bolus |
| 3                    | Cy 1.0 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 4                    |                                         | 1.0 g / i.v. / bolus |
| 6                    | Cy 1.0 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 7                    |                                         | 1.0 g / i.v. / bolus |
| 9                    | Cy 1.0 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 10                   |                                         | 1.0 g / i.v. / bolus |
| 12/15/18/21/24/27/30 |                                         |                      |

- Hiper-hidratação: S.F. + KCL 30mEq/L + NaHCO<sub>3</sub> 30 mEq/L(3000 ml/m<sup>2</sup>/24 horas).
- Furosemide 20mg antes da primeira administração do CY
- PH urina > 7, avaliação a cada 2 horas, NaHCO<sub>3</sub> 8.4% quando necessário.
- Diurese a cada 2 horas, balanço a cada 12 horas-a ser corrigido com furosemide quando necessário.
- Acetazolamide 250 mg p.o . a cada 6 horas, começando 4 horas antes do CY.
- Ondanstrone 8 mg antes do CY e toda 8 hs i.v. quando necessário

\* Começo da hiper-hidratação, deve ser de no mínimo 12 horas antes de iniciar a CY.

## ***ANEXO II***

## Protocolo de tratamento para Cy (7 g/m<sup>2</sup>)

| Hora              | Ciclofosfamida                          | Uromitexan           |
|-------------------|-----------------------------------------|----------------------|
| 0                 | Cy 1.4 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 1                 |                                         | 1.5 g / i.v. / bolus |
| 3                 | Cy 1.4 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 4                 |                                         | 1.5 g / i.v. / bolus |
| 6                 | Cy 1.4 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 7                 |                                         | 1.5 g / i.v. / bolus |
| 9                 | Cy 1.4 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 10                |                                         | 1.5 g / i.v. / bolus |
| 12                | Cy 1.4 g/m <sup>2</sup> / i.v. / 1 hora |                      |
| 13                |                                         | 1.5 g / i.v. / bolus |
| 15/18/21/24/27/30 |                                         | 1.5 g / i.v. / bolus |

- Hiper-hidratação: S.F. + KCL 30mEq/L + NaHCO<sub>3</sub> 30 mEq/L(3000 ml/m<sup>2</sup>/24 horas).
- Furosemide 20mg antes da primeira administração do CY
- PH urina > 7, avaliação a cada 2 horas, NaHCO<sub>3</sub> 8.4% quando necessário.
- Diurese a cada 2 horas, balanço a cada 12 horas - a ser corrigido com furosemide quando necessário.
- Acetazolamide 250 mg p.o . a cada 6 horas, começando 4 horas antes do CY.
- Ondanstrone 8 mg antes do CY e toda 8 hs i.v. quando necessário

\* Começo da hiper-hidratação, deve ser de no mínimo 12 horas antes de iniciar a CY.

## ***ANEXO III***

---

### **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

Eu, \_\_\_\_\_, portador ( a ) do RG nº \_\_\_\_\_, estou em acompanhamento pela Disciplina de Hematologia da FCM - Unicamp, devido a doença de base \_\_\_\_\_, no programa de Transplante de Medula Óssea Autólogo, consinto com o procedimento de doação de células progenitoras periféricas por método de aférese em equipamento de fluxo contínuo a que serei submetido ( a ) no dia de hoje.

Declaro ainda que me foi explicado por \_\_\_\_\_, acerca da necessidade de anticoagulação com solução de citrato de sódio, bem como os sintomas que o procedimento poderá ocasionar.

Estou ciente de que o produto de aférese coletado será devidamente armazenado, quantificado valor de CD34+, submetido a análise de cultura de bactérias e a testes que forem necessários para o estudo do mesmo.

Campinas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

---

Assinatura do paciente / responsável

## ***ANEXO IV***

---

## FICHA DE CONTROLE PACIENTE – MOBILIZAÇÃO

PACIENTE: \_\_\_\_\_

FICHA N: \_\_\_\_\_

| Dia | Leu | Gran | Mnc | Hb | Plaq | Cd34sp | Vol | Cd34 | n.af |
|-----|-----|------|-----|----|------|--------|-----|------|------|
| 0   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 1   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 2   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 3   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 4   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 5   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 6   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 7   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 8   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 9   |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 10  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 11  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 12  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 13  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 14  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 15  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 16  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 17  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 18  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 19  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |
| 20  |     |      |     |    |      |        |     |      |      |