



**Katia Aparecida de Brito Eid**

**Mobilização e coleta de CD34+ para transplante autólogo de células progenitoras periféricas hematopoiéticas em pediatria. Análise de duas doses diferentes do G-CSF.**

CAMPINAS

2015





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Katia Aparecida de Brito Eid

**Mobilização e coleta de CD34+ para transplante autólogo de células progenitoras periféricas hematopoiéticas em pediatria. Análise de duas doses diferentes do G-CSF.**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

**Orientador: Simone dos Santos Aguiar**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA KATIA APARECIDA DE BRITO EID E ORIENTADA PELO PROF<sup>ª</sup>. DRA. SIMONE DOS SANTOS AGUIAR

---

Assinatura do(a) Orientador(a)

CAMPINAS

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Eid, Katia Aparecida de Brito, 1964-

Ei26m Mobilização e coleta de CD34+ para transplante autólogo de células progenitoras periféricas hematopoiética em pediatria : análise de duas doses diferentes de G-CSF / Katia Aparecida de Brito Eid. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Simone dos Santos Aguiar.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mobilização de células-tronco hematopoéticas. 2. Leucaférese. 3. Fator estimulador de colônias de granulócitos. 4. Transplante autólogo. I. Aguiar, Simone dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Mobilization and collection of CD34+ cells for autologous transplantation of peripheral blood hematopoietic progenitor cells in children : analysis of two different G-CSF doses.

**Palavras-chave em inglês:**

Hematopoietic stem cell mobilization

Leukapheresis

Granulocyte colony stimulation factor

Autologous transplantation

**Área de concentração:** Saúde da Criança e do Adolescente

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Simone dos Santos Aguiar [Orientador]

Ricardo Mendes Pereira

Emílio Carlos Elias Baracat

Célia Beatriz Gianotti Antoneli

Elvis Terci Valera

**Data de defesa:** 24-04-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Saúde da Criança e do Adolescente

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

KATIA APARECIDA DE BRITO EID

---

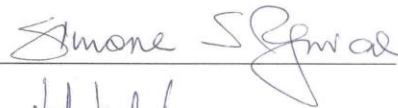
Orientador (a) PROF(A). DR(A). SIMONE DOS SANTOS AGUIAR

---

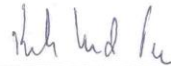
**MEMBROS:**

---

1. PROF(A). DR(A). SIMONE DOS SANTOS AGUIAR



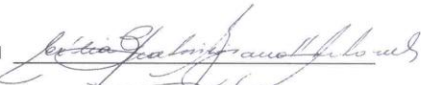
2. PROF(A). DR(A). RICARDO MENDES PEREIRA



3. PROF(A). DR(A). EMÍLIO CARLOS ELIAS BARACAT



4. PROF(A).DR(A). CÉLIA BEATRIZ GIANOTTI ANTONELI



5. PROF(A).DR(A). ELVIS TERCI VALERA



---

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 24 de abril de 2015

---



## Resumo

**Introdução:** As células progenitoras periféricas hematopoiéticas (CPHP) é uma das alternativas de enxerto para a realização de transplante autólogo em crianças, adolescente e adulto jovem portadores de tumores sólidos e linfomas. Na mobilização, a dose clássica de G-CSF é 10µg/kg/peso do paciente SC em dose única. Acredita-se que doses maiores de G-CSF aplicadas duas vezes ao dia aumentariam o número de CD34+ coletadas com o menor número de leucaféreses. A tecnologia atual permite que seja realizado leucaférese em crianças com baixo peso (<10 kg).

**Objetivo:** o mote do estudo foi avaliar se o G-CSF na dose de 15µg/kg peso do paciente ao dia e fracionado em duas doses, 10µg/kg e 5µg/kg, diminuiria o número de leucaférese realizada para atingir o mínimo de  $3 \times 10^6$ /kg/peso do paciente de CD34+ quando comparada com G-CSF na dose convencional, 10µg/kg/peso do paciente em dose única.

**Métodos:** Os pacientes foram divididos em dois grupos. Grupo 10 formado por pacientes que receberam G-CSF 10µg/kg/peso SC ao dia em dose única às 6h e grupo 15 formado por pacientes que receberam G-CSF 15µg/kg/peso SC ao dia dividido em duas vezes, 10µg/kg SC às 6h e 5µg/kg SC às 18h. As leucaféreses foram realizadas em um separador celular automático de fluxo contínuo com anticoagulante ACD-A, foram processados 4 volemias em cada leucaférese. Pacientes com < 20 kg receberam *priming* de concentrado de hemácias filtradas e irradiadas (CHFI) durante as leucaféreses. A realização do transplante autólogo ocorreu com o número mínimo de  $3 \times 10^6$ /kg/peso de CD34+.

**Resultados:** Sessenta e cinco pacientes portadores de tumores sólidos e linfomas foram avaliados, 39 pacientes receberam 10µg/kg/peso SC ao dia em dose única às 6h de G-CSF e 26 pacientes receberam 10µg/kg SC às 6h e 5µg/kg SC às 18h de G-CSF. Foram realizadas 146 leucaféreses, 110 (75,3%) no grupo 10 e 36 (24,7%) leucaféreses no grupo 15. No grupo 10 foi obtido uma mediana de 3 (1-7) leucaféreses e coletado uma média de  $8,89 \times 10^6$ /kg ( $\pm 9,59$ ) de CD34+, o grupo 15 realizou uma

mediana de 1 (1-3) leucaféreses e coletado uma média de  $5,29 \times 10^6/\text{kg}$  ( $\pm 4,95$ ) de CD34+. Uma diferença estatística importante foi o número de leucaféreses ( $p < 0,0001$ ). Nenhum paciente apresentou intercorrências durante as leucaféreses. Os pacientes que receberam CHFI (<20 kg) não apresentaram hipovolemia nas leucaféreses realizadas.

**Conclusão:** Para coletar o mínimo de  $3 \times 10^6/\text{kg/peso}$  de CD34+, a aplicação de G-CSF  $15 \mu\text{g}/\text{kg/peso}$  fracionada diminuiu significativamente o número de leucaférese realizada.

Mobilização de Células-Tronco Hematopoiéticas. Leucaférese. Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos. Transplante autólogo.



## Abstract

**Introduction:** The peripheral hematopoietic progenitor cells are a graft choice for performing autologous transplantation. In the mobilization, the classical dose of G-CSF is 10µg/kg of the patient in a single dose. There is a theory that higher doses of G-CSF applied twice daily could increase the number of collected CD34+ cells with a smallest number of leukapheresis.

**Objective:** The aim of this study is to evaluate if a fractionated-dose of G-CSF at 15µg/kg of patient may reduce the number of leukapheresis for achieving the minimum target of  $3 \times 10^6$ /kg of CD34+ cells as compared to conventional dose of G-CSF.

**Methods:** Patients were divided into two groups. Group 10: patients who received a single dose daily of G-CSF 10µg/kg and Group 15: patients who received twice dose daily of G-CSF 15µg/kg. The leukapheresis were processed in an automated cell separator. The autologous transplantation happened when the minimum number of  $3 \times 10^6$ /kg CD34+ was reached.

**Results:** Group 10 enrolled 39 patients who received 10µg/kg of G-CSF and group 15 had 26 patients who received 15µg/kg fractionated of G-CSF. There were a total of 146 aphaeresis; 110 (75.3%) in group 10 and 36 (24.7%) group 15. Group 10 collected a median of 3 (1-7) leukapheresis and a mean of  $8.89 \times 10^6$ /kg ( $\pm 9.59$ ) CD34+, whereas group 15 had a median of 1 (1-3) leukapheresis and collected a mean of  $5.29 \times 10^6$ /kg ( $\pm 4.95$ ). The relevant difference statistic was the number of aphaeresis ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** To collect a minimum target of  $3 \times 10^6$ /kg of CD34 +, the application of fractionated-dose of 15µg/kg G-CSF decreased significantly the number of leukapheresis performed.

Hematopoietic Stem Cell Mobilization. Leukapheresis. Granulocyte Colony-Stimulating Factor.

Autologous Transplantation.



## Sumário

Dedicatória .....	xiii
Agradecimentos .....	xv
Lista de ilustrações.....	xvii
Lista de tabelas .....	xix
Lista de abreviaturas e siglas .....	xxi
1. Introdução.....	1
1.1. Hematopoiese .....	1
1.2. Identificação das células progenitoras periféricas hematopoiéticas .....	2
1.3. Transplante autólogo de medula óssea com CPPH .....	3
1.4. Mobilização das células progenitoras periféricas hematopoiéticas .....	6
1.4.1. Mecanismo da mobilização.....	7
1.4.2. Fases da mobilização.....	9
1.4.2.1. Fase 1 Iniciação.....	9
1.4.2.2. Fase 2 Amplificação .....	10
1.4.2.3. Fase 3 Emigração .....	10
1.4.2.4. Fase 4 Adaptação .....	11
1.4.3. Mobilização de CPPH .....	11
1.4.3.1. Mobilização de CPPH com quimioterapia .....	12
1.4.3.2. Mobilização de CPPH com citoquinas.....	13
1.4.3.3. Mobilização de CPPH com quimioterapia e citoquinas .....	15
1.4.3.4. Elementos que dificultam a mobilização .....	16
1.5. Procedimento para coleta e quantidade de CPPH .....	18
1.5.1. Leucaféreses .....	18
1.5.2. Coleta de CPPH .....	19
1.5.3. Quantidade de células CD34+.....	21
2. Objetivo.....	23
3. Material e Métodos .....	25
3.1. Material .....	25
3.1.1. Critérios de Inclusão.....	26
3.1.2 Critérios de exclusão .....	26
3.1.3. Avaliação clínica pré TAMO.....	27
3.2. Métodos.....	28
3.2.1 Quimioterapia de mobilização: .....	28
3.2.2. Esquema de G-CSF .....	30
3.2.3. Acesso Vascular.....	31
3.2.4. Leucaférese de grande volume (LVL).....	32

3.2.4.1. Controle laboratorial após LVL.....	36
3.2.4.1.1. Hb e plaquetas pós LVL.....	36
3.2.4.1.2. Dosagem sérica de eletrólitos após LVL.....	36
3.2.5. Cuidados de suporte .....	37
3.2.6. Análise de CHHP .....	38
3.3. Análise estatística.....	39
4. Resultados.....	41
4.1. Características dos pacientes .....	41
4.1.1. Características dos pacientes do Grupo 10µg/kg.....	41
4.1.2. Características dos pacientes do Grupo 15µg/kg.....	43
4.1.3. Características dos pacientes dos grupos 10µg/kg e 15µg/kg .....	45
4.2. EQM.....	47
4.2.1. EQM administrados no grupo 10µg/kg .....	47
4.2.2. EQM do grupo 15µg/kg.....	48
4.2.3. EQM dos grupos 10µg/kg e 15µg/kg .....	49
4.3. G-CSF .....	50
4.4. Acesso Vascular.....	50
4.5. LVL.....	51
4.5.1. LVL do grupo 10µg/kg.....	51
4.5.2. LVL grupo 15µg/kg .....	52
4.5.3. LVL grupos 10µg/kg e 15µg/kg.....	53
5. Discussão.....	57
6. Conclusão .....	63
7. Referências Bibliográficas .....	65
8. Anexos.....	77
8.1. Termo consentimento livre e esclarecido/Aprovação do CEP .....	77
8.1.1. Termo de consentimento para coleta de CPP.....	80
8.2. <i>Performace status</i> .....	81
8.2.1. <i>Karnofsky Performace status</i> .....	81
8.2.2. <i>Lansky Performace status</i> .....	81
8.3. Estadiamento .....	82
8.3.1. Classificação de Ann Arbor .....	82
8.3.2. Classificação de Murfy.....	82
8.3.3. Tabela INSS.....	83
8.4. Técnica para coleta de CHHP em separador celular.....	84

## **Dedicatória**

*“À minha filha Tássia e ao meu marido João pelo amor incondicional que me transformaram numa pessoa melhor e pelo apoio sem o qual não conseguiria nada.”*



## **Agradecimentos**

A Deus por permitir que eu tenha alcançado tantas glórias na vida.

A professora Dra. Simone dos Santos Aguiar que me orientou nesta jornada, pelo apoio e por ser fonte de inspiração. Agradeço também por ter se tornado uma grande amiga.

A Dra. Eliana Miranda que foi imprescindível na análise dos resultados deste trabalho e pela ajuda na finalização do artigo.

A minhas grandes amigas da oncologia, Dra. Iva, Dra. Camila, Dra. Thais, Dra. Ana Flávia e Dra. Mayra, Dra. Ana Rosa e Dra. Juliana por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Aos meus amigos da hematologia pela dedicação aos nossos pacientes nos plantões noturnos, fins de semana e feriados.

A Letícia Abreu por me ouvir e me apoiar nesta jornada.

A Dra. Regina Mendonça pela infinita paciência com nossos pacientes.

A Joyce Rico pela eficiência na identificação da peça mais importante deste trabalho, as células progenitora, sem as quais este projeto não se desenvolveria.

A Alessandra Salgado que por muitas vezes me socorreu com as análises de última hora.

A equipe do ambulatório de oncologia do Centro Infantil Boldrini por receber com tanto carinho e atenção nossos pacientes.

A equipe de enfermagem da unidade de transplante de medula óssea do Centro Infantil Boldrini por sua dedicação aos nossos pacientes.

A equipe da hemoterapia do Centro Infantil Boldrini, Dra. Mônica e Dr. Fabrício que sem vocês este trabalho não seria possível.

A equipe da cirurgia pediátrica do Centro Infantil Boldrini pela colocação do cateter com tanta

eficiência.

Ao pessoal do laboratório de análises clínicas do Centro Infantil Boldrini pelo excelente trabalho realizado.

Aos meus irmãos Cinthia, Patrícia e Arnaldo por serem pessoas maravilhosas.

Aos meus sobrinhos Carolina, Julia, Lucas, Arthur e Heitor por permitir que eu enxergue um futuro melhor.

A minha filha Tássia que sempre me incentivou em tudo na vida.

Ao meu marido João por seu amor, paciência e apoio incondicional.



## **Listas de ilustrações**

Figura 1: Hematopoiese normal em humanos.

Figura 2: Modelo do processo de mobilização.

Figura 3: Locais de aplicação do G-CSF.

Figura 4: Cateter de Hickman®.

Figura 5: Separador celular automático de fluxo contínuo.

Figura 6: Total de leucaféreses realizadas no grupo 10 $\mu$ /kg e 15 $\mu$ g.

Figura 7: Quantidade de células CD34+ coletadas no grupo 10 $\mu$ /kg e 15 $\mu$ /kg.



## Listas de tabelas

Tabela 1: Características dos pacientes do grupo 10 $\mu$ g/kg.

Tabela 2: Características dos pacientes do grupo 15 $\mu$ g/kg.

Tabela 3: Características dos pacientes dos grupos 10 $\mu$ g/kg e grupo 15 $\mu$ g/kg.

Tabela 4: EQM administrados no grupo 10 $\mu$ g/kg.

Tabela 5: EQM administrados no grupo 15 $\mu$ g/kg.

Tabela 6: EQM administrados nos grupo 10 $\mu$ g/kg e 15 $\mu$ g/kg.

Tabela 7: LVL realizadas no grupo 10 $\mu$ g/kg.

Tabela 8: LVL realizadas no grupo 15 $\mu$ g/kg.

Tabela 9: LVL realizadas nos grupos 10 $\mu$ g/kg e 15 $\mu$ g/kg.

Tabela 10: células CD34+ coletadas versus CD34+ préleucaférese.



## Listas de abreviaturas e siglas

ACD: anticoagulante ACD fórmula A

Ca: cálcio

CFC-GM: célula progenitora formadora de colônia de granulócitos e monócitos

CFC-M: célula formadora de colônia mista

CHFI: concentrado de hemácias filtradas e irradiadas

CIB: Centro Infantil Boldrini

C-*KIT*: receptor de fator de *stem cell* CD117

CP: células progenitoras

CPFI: concentrado de plaquetas filtradas e irradiadas

CPH: células progenitora hematopoiética

CPPH: células progenitora periférica hematopoiética

CPPI: célula progenitora primitiva

CXCR4: receptor celular derivado do fator 1

CY: ciclofosfamida

CY/Adria: ciclofosfamida e adriamicina

CY/MTX/Vp-16: ciclofosfamida, metotrexato e etoposida

CY/Vp-16: ciclofosfamida e etoposida

Beta-HCG: hormônio beta coriônico gravídico

DHAP: dexametasona, citarabina e cisplatina

EQM: esquema quimioterápico de mobilização

EV: via endovenosa

EWING: Sarcoma de Ewing

FC: frequência cardíaca

FCHR: fator de crescimento hematopoiético recombinante

G-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos

GSF: fator estimulante de granulócitos

Hb: hemoglobina

ICE: ifosfamida, carboplatina e etoposida

IFO/P/DOXO/Vp-16: ifosfamida, cisplatina, doxorubicina e etoposida

IL-8: interleucina 8

INSS: tabela de classificação de neuroblastoma.

K: potássio

LFA-1: *leukocyte function associated molecule 1*

LH: Linfoma de Hodgkin

LNH: Linfoma não Hodgkin

LVB: leucaférese de baixo volume

LVL: leucaférese de grande volume

Medulo: Meduloblastoma

MIBG: Iodine-131-meta-iodobenzyIguadine

MMP-9: metaloproteinase

MO: medula óssea

Na: sódio

Nadir: recuperação da aplasia medular causada por quimioterapia mielosupressora ou altas doses

NB: Neuroblastoma

N-MYC: gene N-MYC

PAS: pressão arterial sistêmica

PET-SCAN: *positron emission tomography scan*

Pi: fósforo

PSB: tampão fosfato salino

SC: via subcutânea

SDF-1: fator 1 derivado da célula estromal

Separador celular: separador celular automático de fluxo contínuo

SMD: Síndrome mielodisplásica

SO<sub>2</sub>: saturação de oxigênio

SUS: Sistema Único de Saúde

TAMO: transplante autólogo de medula óssea

TCG: Tumor de células germinativas

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TGI: trato gastrointestinal

TIP: Taxol, ifosfamida e cisplatina

Topo/CY: Topotecan e ciclofosfamida

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UTI: unidade de terapia intensiva do CIB

Unidade de transplante: unidade de transplante do CIB

VLA-4: *very late antigen 4*

VLA-5: *very late antigen 5*

VO: via oral





# 1. Introdução

## 1.1. Hematopoiese

Hematopoiese é o processo de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue a partir de um precursor celular comum e indiferenciado conhecido como célula hematopoiética pluripotente, unidade formadora de colônia ou *stem cell* (Abramson, Miller et al. 1977).

Nas primeiras semanas de gestação, aproximadamente no 19º dia, o saco vitelino é o principal local de hematopoiese (Woods 1982). De seis a sete meses de vida fetal, o fígado e o baço são os principais órgãos envolvidos e continuam a produzir células sanguíneas até cerca de duas semanas após o nascimento.

A medula óssea (MO) dos ossos chatos, é o local mais importante a partir do sétimo mês de vida fetal e, durante a infância e a vida adulta, é a única fonte de novas células sanguíneas (Abramson, Miller et al. 1977; Woods 1982).

Células em vários estágios de maturidade são encontradas na MO, também há as células mais jovens, que são as precursoras das linhagens de células maduras que formam o sangue, essas células que são denominadas de pluripotentes (Abramson, Miller et al. 1977).

As células pluripotentes representam 0,05% das células nucleadas que constituem a MO, e seu diferencial é a capacidade de proliferação, diferenciação e renovação por si só. Destas células pluripotentes é que surgem as células formadoras de colônias mistas (CFC-M) que por sua vez formam as células progenitoras formadoras de colônias de granulócitos/monócitos (CFC-GM) que são as responsáveis pela produção de neutrófilos (Metcalf 1990).

Em estado fisiológico as células progenitora hematopoiética (CPH) estão em número muito reduzido no sangue periférico, mas quando mobilizadas atingem quantidade suficiente para serem

coletadas e utilizadas no transplante autólogo de medula óssea (TAMO) (Kessinger, Armitage et al. 1988; Williams, Bitran et al. 1990; Berenson, Bensinger et al. 1991).

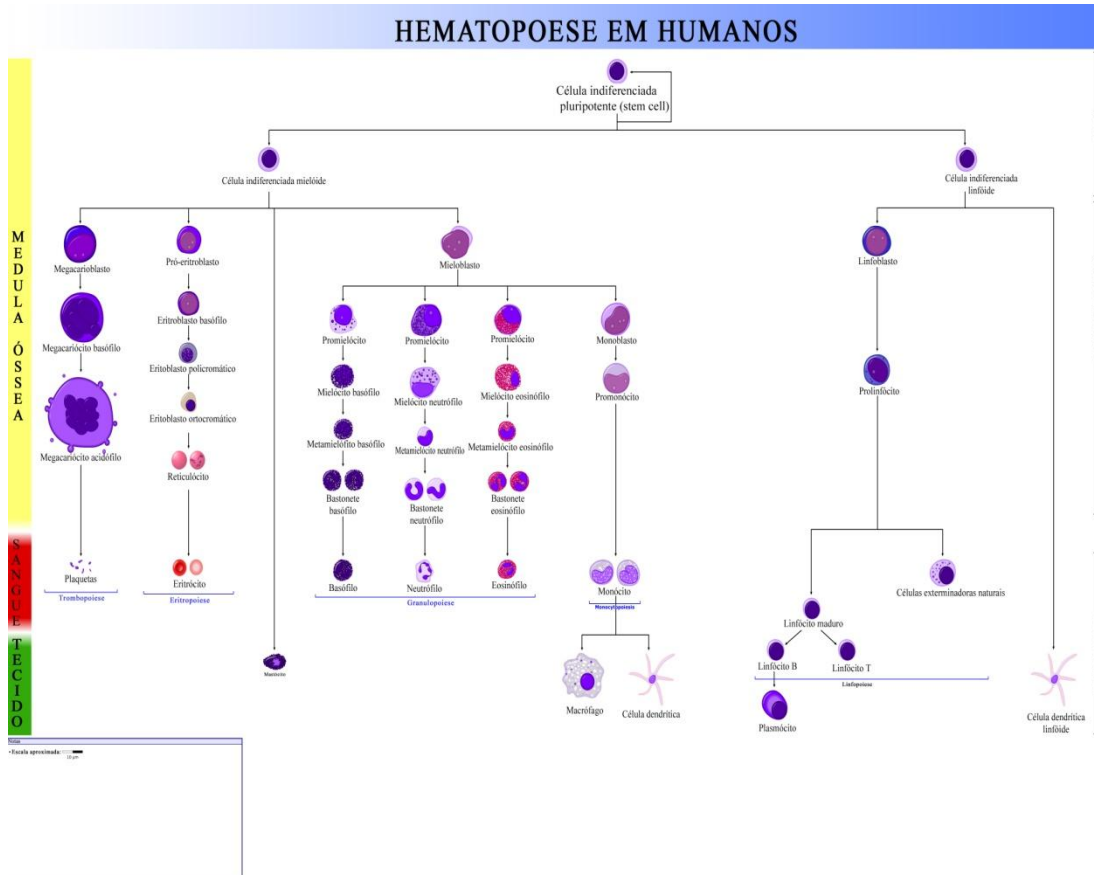


Figura 1: Hematopoese normal em humanos. (Fonte: domínio público)

## 1.2. Identificação das células progenitoras periféricas hematopoiéticas

As células progenitoras periféricas hematopoiéticas (CPPH) possuem em sua superfície um antígeno de superfície denominado CD34+. As células com marcador CD34+ são capazes de reconstituir a MO após uso de terapia mieloablativa. (Anderlini, Rizzo et al. 2001).

No produto de leucaférese as CPPH podem ser quantificadas pelo número de colônias de CFC-GM semeadas em cultura. Esta técnica prediz com segurança a reconstituição hematopoiética após quimioterapia. Contudo é um método que demora a fornecer o número de colônias, leva cerca de 15 dias para liberação do resultado. (Juttner, To et al. 1989).

A quantidade de CPPH pode ser determinada por citometria de fluxo. Em uma hora após a leucaférese temos o número de células CD34+ coletadas (Sutherland, Keating et al. 1994; Keeney, Chin-Yee et al. 1998; Groto and Noronha 2003). A citometria de fluxo além de rápida e tão segura quanto à cultura de CFC-GM (D'Arena, Musto et al. 1996).

### **1.3. Transplante autólogo de medula óssea com CPPH**

O uso terapêutico de MO humana vem desde século XIX, na época era usada via oral (VO). O uso endovenoso (EV) foi aplicado pela primeira vez por Thomas em 1937 nos Estados Unidos e 1959 na França, por Mathé (APUD Marques 2000). Nos anos 70 com o entendimento de histocompatibilidade humana, avanço da hemoterapia, a MO humana passou a ser usada como uma opção de tratamento (Appelbaum, Herzig et al. 1978).

A coleta de células de MO era realizada através de aspiração, punções de repetições na crista ilíaca posterior bilateral. Mas é altamente doloroso para o paciente, exigem obrigatoriamente à internação do paciente, uso de anestesia geral e/ou anestesia peridural durante a coleta de MO, podem causar anemia por grande perda de sangue (Appelbaum, Herzig et al. 1978).

Alguns fatores podem ser impeditivos para a coleta de MO: o paciente pode não apresentar condições clínicas para ser anestesiado, pode haver dificuldade na obtenção das células da MO por ter a

região do osso ilíaco e/ou região próxima a ele sido previamente irradiada e pode ter havido ao diagnóstico infiltração da MO pela patologia de base (Appelbaum, Herzig et al. 1978).

Na vida fetal há a existência de células progenitoras periféricas hematopoiéticas (CPPH) que promovem a produção de MO. Em condições clínicas pré-determinada, por exemplo, mieloablação, as CPPH são capazes de repovoar a MO. As CPPH então passaram a ser considerada como fonte de MO (Korbling 1991).

Desde o fim dos anos 80 a utilização de CPPH tem sido o método de coleta de células mais usado em TAMO, por ser considerado seguro, promove a recuperação hematopoiética mais rápida, com menor risco de contaminação do enxerto por células neoplásicas quando comparada a coleta por MO (Anderlini and Champlin 2002).

Para a coleta de CPPH não há uso de anestesia geral; e este método de coleta não causa anemia, pois não há perda de sangue (Juttner, To et al. 1989).

Naturalmente temos CPPH circulando no sangue periférico, mas em pequeno numero não se conseguindo colher quantidade suficiente de CPPH para que aja reconstituição hematopoiética adequada da MO (Udomsakdi, Lansdorp et al. 1992).

Após uso de altas doses de quimioterapia, na recuperação medular, o número de CPPH aumenta na periferia, mas é transitório (To, Shepperd et al. 1990).

Obtém se número suficiente de CPPH no sangue periférico após quimioterapia em altas doses combinado com o uso de fatores de crescimento hematopoiético recombinante (FCHR), este fenômeno é conhecido como mobilização (To, Shepperd et al. 1990; Udomsakdi, Lansdorp et al. 1992; Demirer, Buckner et al. 1996).

Um dos fatores de crescimento mais usado é o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF). O uso do G-CSF aumenta significativamente número de CPPH circulante (Majolino, Marceno et al. 1995; Hiura, Murakami et al. 1995).

Sabe-se também que o uso por dias seguidos de G-CSF, com a finalidade de mobilização, propicia um aumento mais significativo de CPPH circulante conseguindo-se colher, através de leucaféreses, grande quantidade de células (Boiron, Marit et al. 1993; Marques 2000; Delamain 2004).

O transplante com CPPH mostrou-se eficaz, seguro, com menos risco de contaminação por células neoplásicas, promovendo rápida recuperação hematológica, conseqüentemente menor período de neutropenia, trazendo menos risco ao paciente e menor custo. (Korbling 1991; D'Arena, Musto et al. 1998; Marques 2000; Anderlini and Champlin 2002; Nervi, Link et al. 2006). Por estas razões o uso de transplante TAMO com CPPH cresceu progressivamente.

Na última década foram realizados cerca de 32000 transplantes no mundo, tendo CPPH como fonte de células na sua maioria (Pasquini, Wang et al. 2010). Nos EUA, na população pediátrica quando indicado transplante de MO, 91% colheram CPPH, e as doenças com maiores indicações foram os linfomas e os tumores sólidos (Pasquini, Wang et al. 2010).

O TAMO com CPPH vem sendo utilizado amplamente como forma de tratamento em tumores sólidos e linfomas na criança, adolescentes e adultos jovens (Reisner and Segall 1995; Ladenstein, Pearce et al. 1997; Brugieres, Quartier et al. 2000; Castro, Seber et al. 2005; Castro, Mendes, Seber et al. 2005; Petropoulos and Chan 2005; Juergens, Weston et al. 2006; Kondagunta and Motzer 2006; Bradley and Cairo 2008; Ladenstein, Potschger et al. 2008; Matthay, Reynolds et al. 2009; Burkhardt, Reiter et al. 2009; Castro, Brunetto et al. 2011).

## 1.4. Mobilização das células progenitoras periféricas hematopoiéticas

As CPPH que naturalmente circulam no sangue periférico são insuficientes para serem coletadas (Udomsakdi, Lansdorp et al. 1992).

Sob algum tipo de *stress* a MO sofre um desequilíbrio na homeostase, levando a um aumento na produção de CPPH, que acabam migrando para o sangue periférico em número suficiente para serem coletadas. Esse fenômeno ocorre naturalmente frente a um processo inflamatório ou de injúria celular (Wardyn, Rennard et al. 2008; Van Craenenbroeck, Vrints et al. 2008).

Um maratonista após o término da corrida apresenta leucocitose, com número de células CD34+ aumentadas, isto é decorrente dos altos níveis de G-CSF e de outras citocinas liberadas em resposta ao esforço físico extremo (Bonsignore, Morici et al. 2002; Delamain 2004).

Apesar de este aumento ser pequeno, aproximadamente quatro vezes o basal, transitório (em poucas horas voltam para os níveis normais) e insuficiente para serem coletadas, mostrou que a mobilização das CPPH é um fenômeno possível de ser induzido (Cline and Golde 1977; Barrett, Longhurst et al. 1978; Marques 2000; Delamain 2004).

O uso de quimioterapia em altas doses combinada com de uso FCHR, reproduziram o descrito acima (Lapidot and Petit 2002; Cottler-Fox, Lapidot et al. 2003) e promoveram produção suficiente de células CD34+ para serem coletadas por aférese e utilizadas em TAMO (Nervi, Link et al. 2006).

### 1.4.1. Mecanismo da mobilização

A mobilização é um arrolamento de células progenitoras hematopoiéticas (CPH) para o sangue periférico, após o uso de quimioterapia mielosupressora e FCHR. Sendo G-CSF o FCHR mais usado (Fu and Liesveld 2000).

A mobilização simula o que ocorre fisiologicamente quando, na vigência de processo inflamatório, a MO libera para o sangue periférico as CPH (Fu and Liesveld 2000).

Evidências demonstraram que as moléculas de adesão celular podem estar envolvidas no processo da mobilização. As células CD34+ mobilizadas por vários regimes e citocinas apresentam reduzida expressão de certas moléculas de adesão celular em relação às CD34+ medulares em condições fisiológicas, com consequente modificação da capacidade de adesão ao estroma medular (Lund-Johansen and Terstappen 1993).

Fisiologicamente, esta adesividade é responsável pela retenção das células progenitoras primitiva (CPPI) na MO e, qualquer quebra nesta interação levaria as CPH para o sangue periférico, caracterizando a mobilização (Lund-Johansen and Terstappen 1993; To, Haylock et al. 1997).

A adesão das células hematopoiéticas aos elementos estromais é mediado por um número de moléculas de adesão celular da família das integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  e L-selectinas.

Alterações no estado de proliferação, nas respostas a FCHR e citocinas, nos antígenos de superfície e na expressão das moléculas de adesão, estão envolvidas no processo de mobilização. (Perey, Peters et al. 1998; Kroger, Zeller et al. 1999; Delamain 2004; Martin-Antonio, Carmona et al. 2011).

Através do marcador CD34+ das CPPH, podemos quantificar as CPH que circulam no sangue periférico em estado de repouso. Foi demonstrado em cultura, que essas células quando expostas a

citoquinas hematopoiéticas reproduzem-se mais rápido que as células progenitoras (CP) encontrada na MO.

Este fenômeno foi demonstrado por Bellucci e colaboradores em 1999 (Bellucci, De Propris et al. 1999), nas CPH CD34+ mobilizadas para o sangue periférico os níveis de L-selectina estão aumentados e os níveis de  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e L-selectinas estão diminuídos.

Agora as expressões dos níveis do receptor de fator de *stem cell* CD117 (*c-kit*) e do receptor celular derivado do fator 1 (CXCR4) estão diminuídos nas CPH CD34+ do sangue periférico mobilizadas quando comparadas a células CD34+ da MO (Bellucci, De Propris et al. 1999; Nervi, Link et al. 2006; Martin-Antonio, Carmona et al. 2011).

A  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e L-selectinas são as moléculas de adesão celular mais envolvida na adesão da célula progenitora à matriz extracelular. As alterações das  $\beta 1$  e  $\beta 2$  podem resultar na saída da MO de grande número de progenitores hematopoiéticos para o sangue periférico (Bellucci, De Propris et al. 1999; Nervi, Link et al. 2006; Martin-Antonio, Carmona et al. 2011).

Em 1999 Bellucci e colaboradores (Bellucci, De Propris et al. 1999) demonstraram que após 5 dias de uso de FCHR, tipo G-CSF, as células CD34+ apresentaram um decréscimo na expressão de  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e L-selectina e uma aderência diminuída às células estromais, quando comparadas as células periféricas em situação fisiológica.

Vários estudos confirmam o demonstrado por Bellucci (Bellucci, De Propris et al. 1999), que após uso de fator estimulante de granulócitos (GSF) há alteração da adesão das CP ao estroma medular (Nervi, Link et al. 2006; Jin, Zhai et al. 2008; Martin-Antonio, Carmona et al. 2011).

Todos estes dados demonstram que a mobilização das CPPH, é resultado das alterações citoquinas-induzidas, na função integrina nas células CD34+ (Jin, Zhai et al. 2008; Martin-Antonio, Carmona et al. 2011).



Podemos dividir em 4 fases o processo de mobilização:

Fase 1 Iniciação.

Fase 2 Amplificação.

Fase 3 Emigração.

Fase 4 Adaptação.

## **1.4.2. Fases da mobilização**

### **1.4.2.1. Fase 1 Iniciação**

O que ocorre na fase 1 (iniciação) é a ação dos agentes mobilizadores, como G-CSF, dando início a mobilização.

O G-CSF é a citocina mais usada na mobilização das CPPH. Sua utilização é segura, eficaz e com poucos efeitos colaterais, além de ser a citocina mais potente (Nervi, Link et al. 2006).

As CP mobilizada respondem menos ao fator 1 derivado da célula estromal (SDF-1) promovendo a locomoção das células através do endotélio. Isto ocorre devido à diminuição da capacidade de adesão estromal, diminuição da expressão CXCR4 e diminuição das células CD34+ em fase de maturação (Liu, Poursine-Laurent et al. 1997).

Cercam as CPH as células estromais (fibroblastos, adipócitos, macrófagos e células endoteliais). Essas células são responsáveis pelo sistema de moléculas de adesão celular. As integrinas, selectinas, imunoglobulinas e moléculas de *proteoglicans* são as principais moléculas de adesão celular. Este sistema promove a adesão celular entre célula-célula-matriz (Fibbe, Pruijt et al. 2000).

Nas CPH como nas células estromais, há receptores de integrinas. As integrinas são glicoproteínas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) que agem nas interações célula-célula, promovendo a migração, proliferação, diferenciação e apoptose celular (Lataillade, Clay et al. 2000).

As integrinas, principalmente very late antigen (VLA) 4 e 5 e leukocyte function associated (LFA) 1, participam do processo de mobilização. A diminuição das integrinas altera a adesão celular das CPH com a MO, promovendo sua liberação para o sangue periférico. O uso de quimioterapia mieloablativa e citocinas (G-CSF) no processo de mobilização causa a diminuição das integrinas (Bellucci, De Propriis et al. 1999; Fu and Liesveld 2000).

#### **1.4.2.2. Fase 2 Amplificação**

Nesta fase ocorre intensificação da interação entre CPH, MO (matriz- célula), FCHR, citocinas (Fibbe, Pruijt et al. 2000).

Há também nesta fase intensificação e ampliação do mecanismo de interação descrito na fase de iniciação (Bellucci, De Propriis et al. 1999).

#### **1.4.2.3. Fase 3 Emigração**

Nos sinusoides, na região de células de junção endotelial e nas áreas em que há fragilidade de membrana celular ocorre a fase de emigração.

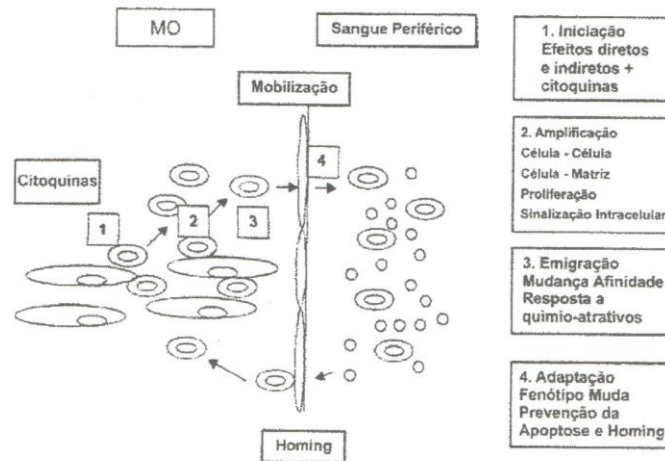
Alterações na matriz medular, composta por colágenos, glicoprotéinas, *glicoaminocans*, colágenos e MMP-9, interferem na interação MO-sangue periférico, liberando CPH para o sangue periférico.

A destruição de CPH maduras por agentes quimioterápicos desencadeiam o processo de mobilização. A matriz extracelular da MO na mobilização é degradada pela ação da MMP-9 (Janowska-Wieczorek, Marquez et al. 1999; Jin, Zhai et al. 2008).

Esta fase também é caracterizada pela diminuição de resposta das CPH a agentes químicos do estroma, levando a diminuição da atividade de adesão celular a MO e conseqüentemente liberando as CPH para o sangue periférico.

#### 1.4.2.4. Fase 4 Adaptação

As mudanças ocorridas nas fases de mobilização (iniciação, amplificação e emigração) dão condições (adaptação) para que as células sobrevivam no sangue periférico (Whetton and Graham 1999; Fu and Liesveld 2000; Jin, Zhai et al. 2008).



**Figura 2: Modelo do processo da mobilização (Fonte: Lu and Liesveld, 2000).**

### **1.4.3. Mobilização de CPPH**

#### **1.4.3.1. Mobilização de CPPH com quimioterapia**

A quimioterapia foi o primeiro mecanismo de mobilização das CPH para o sangue periférico (Reiffers, Bernard et al. 1986; Korbling 1991).

Após quimioterapia mielosupressora ou em altas doses ocorre um aumento CPH no sangue periférico. Há neste momento quantidade de CPPH para ser coletada e usada, promovendo recuperação hematopoiética normal da MO (Kessinger, Armitage et al. 1986; Reiffers, Bernard et al. 1986; Juttner, To et al. 1988).

Entretanto alguns pacientes, especificamente pacientes com doença em progressão, MO infiltrada, irradiados e previamente expostos a agentes alquilantes, falham em responder a quimioterapia, e não conseguem colher números de CPPH suficientes (To, Shepperd et al. 1990).

Outro fator que pode dificultar a coleta de células CD34+ é o fato dos pacientes terem sua recuperação medular em tempos diferentes após o uso de quimioterapia, não havendo maneira de prever se a coleta de CPPH (To, Haylock et al. 1997).

Com a descoberta dos FCHR, os protocolos com uso exclusivo de quimioterapia mielosupressora para mobilização foram descontinuado (To, Haylock et al. 1997; Lefrere, Bernard et al. 1999; Lefrere, Makke et al. 1999).

Socinski em 1988 e Gianni em 1989 (Socinski, Cannistra et al. 1988; Gianni, Siena et al. 1989), reportaram que a administração de G-CSF ou fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) aumenta em até 1000 vezes o número de CPH no sangue periférico na recuperação após quimioterapia quando comparada com antes do tratamento.

### 1.4.3.2. Mobilização de CPPH com citocinas

Citoquinas são proteínas pequenas que mediam e regulam a imunidade, inflamação e a hematopoiese. Elas são produzidas em resposta a um estímulo imunológico. Agem por ligação específica em receptores de membrana, ativando a via de mensageiros, normalmente uma tirosinoquinase, modificando a expressão gênica e a função celular, como a proliferação, ativação e diferenciação celular (Nervi, Link et al. 2006; Krzyzanski, Wiczling et al. 2010).

O pico de células CPPH, mesmo usando se diferentes FCHR ocorrem em média após 7-10 dias de sua aplicação diária (Lane, Law et al. 1995; Liu, Poursine-Laurent et al. 1997; Kawano, Watanabe et al. 1999; Lefrere, Bernard et al. 1999).

O descrito acima não é equivalente para a quantidade de CPPH mobilizadas, o uso de diferentes FCHR mobilizam números diferentes de CPP, muitas vezes mobilizando numero insuficiente de células CD34+ para utilização no TAMO (Lefrere, Makke et al. 1999; Kroger, Zeller et al. 1999).

O G-CSF é a citocina disponível mais potente (Nervi, Link et al. 2006) e a mais utilizada na mobilização de CPPH (Pasquini, Wang et al. 2010). Em sinergismo com outros fatores de crescimento, o G-CSF promove uma mobilização adequada (Anderlini and Champlin 2002; Krzyzanski, Wiczling et al. 2010).

Com a administração de 10µg/kg/dia de G-CSF por 5 dias consecutivos conseguiu-se coletar > 5x10<sup>6</sup> de CD34+/kg de peso do receptor, dose considerada suficiente para reconstituir a MO com rapidez e eficiência (Schmitz, Bacigalupo et al. 1996; Anderlini and Champlin 2002; Delamain 2004; Watanabe, Watanabe et al. 2006).

A toxicidade do G-CSF é baixa e bem tolerada. Nos doadores de MO sadios a queixa mais comum é dor óssea leve, iniciando-se após 2 ou 3 aplicações (Anderlini, Przepiorka et al. 1996; Akizuki, Mizorogi et al. 2000).

Outros efeitos colaterais do G-CSF incluem fadiga, cefaleia e náuseas. Poucos requerem redução de dose ou mesmo descontinuidade da droga (Nervi, Link et al. 2006).

A dose clássica de G-CSF para mobilização tanto em TAMO com CPPH quanto em transplantes alogênicos é 10µg/kg/peso do paciente ou doador, SC, administrada uma vez ao dia. Dose considerada eficaz para induzir um grande número de CPH para o sangue periférico (Henon, Liang et al. 1992; Schmitz, Linch et al. 1996; Anderlini and Champlin 2002; Watanabe, Watanabe et al. 2006).

Alguns autores sugerem que doses de 12,5-50µg/kg/dia de G-CSF (filgrastima), e fracionada em duas aplicações diárias aumenta o número de CD34+ coletadas com menor número de leucaférese (Waller, Bertz et al 1996; Weaver, Birch et al 1998; Engelhardt, Bertz et al. 1999; Kobbe, Sohngen et al. 1999; Kroger, Zeller et al. 1999).

Em 1999 Kroger e colaboradores (Kroger, Zeller et al. 1999) mostraram o perfil farmacológico do G-CSF (filgrastima) administrado em pacientes e doadores. O G-CSF atinge o nível sérico máximo entre 2h às 8h após administração via subcutânea (SC), sua meia vida é curta, de aproximadamente 3 à 4h independentemente da via administrada. Então considerou-se que a aplicação de filgrastima uma vez ao dia poderia ser sub-ótima.

Estes mesmos autores realizaram um estudo, não prospectivo e não randomizado comparando filgrastima na dose de 10µg/kg/peso SC uma vez ao dia com dose de 5µg/kg/peso SC duas vezes ao dia num grupo de pacientes com o mesmo diagnóstico, idades e *status* da doença comparáveis, tipo de tratamento pré TAMO semelhantes e alguns foram mobilizados com quimioterapia. Concluiu-se que o grupo de 2x 5µg/kg/peso colheu duas vezes mais células CD34+ na primeira leucaférese realizada. E

também foi maior o número de CD34+ no total de aféreses do grupo de 2x 5µg/kg/peso e menos aféreses realizadas neste grupo com mais CD34+ quando comparadas ao grupo de 10µg/kg/peso.

Uma provável explicação para o aumento de células CD34+ na divisão da dose seria o “*timing*” de aplicação do G-SCF. Estudo da cinética do pico de CD34+ no sangue periférico após injeção de G-CSF mostrou ser alcançado entre 6 à 12h. Mas o grupo não conseguiu confirmar este mecanismo. Acredita se que haja outros mecanismos envolvidos, porque neste estudo, nos dois grupos a última dose de filgrastima foi administrada de 1 à 2h antes da leucaférese.

#### **1.4.3.3. Mobilização de CPPH com quimioterapia e citoquinas**

O uso de quimioterapia mielosupressora ou altas doses em associação com FCHR (G-CSF) tem sido usado com sucesso na mobilização de CPPH e redução na contaminação de células neoplásicas. O uso sequencial de quimioterapia citotóxica seguida da administração de G-CSF têm resultado em boas aféreses (Ravagnani, Siena et al. 1990; Bensinger, Weaver et al. 1995; Watanabe, Kawano et al. 1999; Marques 2000; Delamain 2004).

Estudo não randomizado demonstrou claramente o benefício da mobilização com quimioterapia e G-CSF quando comparado a citoquinas isoladas (Marques 2000; Delamain 2004; Nervi, Link et al. 2006).

Estes esquemas são seguros e bem tolerados com grande capacidade de mobilização e ação nas células neoplásicas (Marques 2000; Delamain 2004; Nervi, Link et al. 2006).

A ciclofosfamida (CY), na mobilização de CPPH, como droga isolada ou em combinação com outros agentes, é a quimioterapia mais utilizada (Burtness, Psyrri et al. 1999). A CY é um fármaco de amplo espectro com a melhor capacidade mobilizante e apresenta uma correlação positiva entre dose e coleta de CPPH. Doses entre 4 a 7g/m<sup>2</sup> são as de maior capacidade de mobilização (Santini, De Souza

et al. 1999). Altas doses de CY apresentam até 12 vezes mais CD34+ coletadas (Gianni, Bregni et al. 1992).

Alguns esquemas bem tolerados e também usados são: ICE (ifosfamida, carboplatina e etoposida) (Sureda, Petit et al. 1999), DHAP (dexametasona, adriamicina e cisplatina) (Velasquez, Cabanillas et al. 1988) e etoposida 2 a 2,5g/m<sup>2</sup> (Caracciolo, Gavarotti et al. 1993).

Não há na literatura um consenso sobre qual regime de quimioterapia, e em que dose deve ser usada para uma mobilização eficaz (Marques 2000; Delamain 2004; Ketterer, Salles et al. 1998; Nervi, Link et al. 2006; Watanabe, Watanabe et al. 2006).

#### **1.4.3.4. Elementos que dificultam a mobilização**

Alguns autores sugerem que a doença de base dificultem a mobilização e a coleta de células CD34+ (D'Arena, Musto et al. 1998; Weaver, Tauer et al. 1998; Gazitt, Freytes et al. 1999; Sautois, Fraipont et al. 1999; Marques 2000; Delamain 2004). Os pacientes portadores de neoplasias hematológicas como linfoma de Hodgkin (LH) e linfomas não Hodgkin (LNH) têm mais dificuldade de mobilização quando comparado aos pacientes portadores de tumores sólidos.

Esta dificuldade de coleta dos portadores de linfomas pode estar relacionada com quantidade de quimioterapia recebida antes da mobilização. Portadores de LH e LNH recebem mais tratamento quimioterápico antes do TAMO que os portadores de tumores sólidos (D'Arena, Musto et al. 1998; Weaver, Tauer et al. 1998; Gazitt, Freytes et al. 1999; Sautois, Fraipont et al. 1999; Delamain 2004).

Infiltração da MO ao diagnóstico não é preditivo de insucesso na mobilização de CPPH. Se houver negatificação da MO, durante o tratamento quimioterápico, pode se coletar normalmente CPPH (Tarella, Corradini et al. 1999; Delamain 2004).



Em adultos foi demonstrado que as mulheres têm menos chances de mobilizarem adequadamente que os pacientes do sexo masculino. Homens e mulheres têm pesos adequados diferentes, o que poderia explicar a dificuldade das mulheres em mobilizarem (Perea, Sureda et al. 2001; Delamain 2004; Nervi, Link et al. 2006). Não observado em crianças diferença de coleta de CPPH entre os sexos masculino e feminino (Witt, Fischmeister et al. 2001).

A literatura não é clara quando a idade. Alguns estudos sugerem que a idade mais avançada mobilizaria menos CPPH (Nervi, Link et al. 2006). Delamain em 2004 (Delamain 2004) demonstrou que pacientes com mais de 65 anos mobilizaram CPPH adequadamente.

Nenhum estudo realizado em crianças comprovou a facilidade de mobilização (Kanold, Berger et al. 1998; Witt, Fischmeister et al. 2001; Nervi, Link et al. 2006).

A composição dos esquemas quimioterápicos pré-mobilização influenciam no número de células CD34+ coletadas, esquemas com agentes alquilantes, fludarabina, mostarda nitrogenada, procarbazina coletam menos CPPH. Também afetam a mobilização, o período entre o diagnóstico e o início da coleta, o tempo de recuperação pós-quimioterapia mielosupressora, o numero de esquemas recebidos pré-mobilização, o numero de ciclos realizados, duração do tratamento quimioterápico, doses acumuladas de melfalano e ciclofosfamida. A irradiação prévia também dificulta a mobilização. Valores da: albumina, dos leucócitos, da hemoglobina e do hematócrito no dia da aférese e plaquetopenia na época da mobilização são outros fatores que alteram a quantidade de CPPH (Haas, Mohle et al. 1994; Bensinger, Weaver et al. 1995; Dreger, Kloss et al. 1995; Demirer, Buckner et al. 1996; Watts, Sullivan et al. 1997; Ford, Pace et al. 1998; Ketterer, Salles et al. 1998; Marit, Thiessard et al. 1998; Moskowitz, Glassman et al. 1998; Perea, Sureda et al. 2001; Delamain 2004; Nervi, Link et al. 2006).

Alguns autores sugerem que para uma mobilização mais adequada é necessário que ocorra uma inversão na relação entre CXCR4/VLA-4 e as células CD34+, coleta se mais células CD34+ quando os

níveis de CXCR4 e VLA-4 são menores (Anderlini, Rizzo et al. 2001; Gazitt and Liu 2001; Gazitt, Shaughnessy et al. 2001; Jin, Zhai et al. 2008). Outro grupo defende que ocorre correlação inversa entre os níveis de SFA-1 plasmáticos e expressão do CXCR4 na membrana das células CD34+ levando a uma resposta adequada ao G-CSF. Este mesmo grupo propõe que o SFA-1 é fator condicional para a mobilização do CD34+ para o sangue periférico (Benboubker, Watier et al. 2001; Nervi, Link et al. 2006; Martin-Antonio, Carmona et al. 2011).

Em 2000 Marques (Marques 2000) analisou 41 pacientes após quimioterapia altas doses e demonstrou que a recuperação leucocitária precoce pósquimioterapia anuncia um número maior de CPPH com o menor número de leucaféreses realizadas. Em 2006 Basquiera (Basquiera, Abichain et al. 2006) encontrou uma forte relação entre o número de CD34+ no sangue periférico com a quantidade de células CD34+ coletadas, sugerindo iniciar as leucaféreses quando a contagem de CD34+ no sangue periférico for  $\geq 15\mu\text{L}$ .

## **1.5. Procedimento para coleta e quantidade de CPPH**

### **1.5.1. Leucaféreses**

A coleta de quantidade suficiente de CPPH para se assegurar rápida e sustentada hematopoiese após quimioterapia mieloablativa, requer procedimentos de leucaféreses. As leucaféreses são iniciadas assim que há a recuperação dos níveis hematimétricos, leucócitos  $\geq 1000 \text{ uL}$ , em dias seguidos até alcançar o número de células CD34+ almejado.

O termo hemaférese significa a separação e a retenção de um componente sanguíneo, com o retorno ao doador ou paciente, dos componentes restantes. No caso da leucaférese separa-se os leucócitos (CPPH) do restante dos componentes do sangue. O equipamento usa um sistema de

circulação extracorpórea, e por movimentos de centrifugação separa os diversos componentes do sangue (Arnaud, Riemersma et al. 1984; Marques 2000).

Os separadores celulares automático podem ser de fluxo contínuo, de fluxo descontínuo ou por ciclos. Os equipamentos de fluxo contínuo são mais modernos e seguros, sendo os mais utilizados (Marques 2000; Delamain 2004).

A possibilidade de se coletar CPPH por leucaférese foi primeiro demonstrado em indivíduos saudáveis por Korling em 1980 (Korbling, Flidner et al. 1980). E desde então passou a ser o método mais usado nos TAMO (Pasquini, Wang et al. 2010).

Com a tecnologia atual, as leucaféreses podem ser realizadas em crianças muito pequenas e com baixo peso (<20 kg), conseguindo se colher células CD34+ suficiente para uma recuperação medular completa, após quimioterapia altas doses de modo seguro (Leibundgut, von Rohr et al. 1995; Takaue, Kawano et al. 1995; Kanold, Halle et al. 1999; Witt, Fischmeister et al. 2001; Cecyn, Seber et al. 2005; Fontana, Groebli et al. 2006; Ravagnani, Coluccia et al. 2006; Ginani, Seber et al. 2011).

Processando se grandes volemias nas leucaféreses, procedimento conhecido como leucaférese de grande volume (LVL), otimizando a quantidade de células CD34+ coletadas num único procedimento quando comparado com leucaférese de baixo volume (LVB) (Gasova, Marinov et al. 2005). As LVL também podem ser processadas em crianças de baixo peso, menor de 10 Kg (Kanold, Halle et al. 1999; Cecyn, Seber et al. 2005; Fontana, Groebli et al. 2006; Ginani, Seber et al. 2011).

### **1.5.2. Coleta de CPPH**

O momento de iniciar se a coleta de células CD34+ por leucaférese pode ser baseado no tempo de recuperação dos leucócitos após quimioterapia, no numero de leucócitos e plaquetas do sangue periférico e a quantidade de células CD34+ circulando no sangue periférico (Siena, Bregni et al. 1989;

Kotasek, Shepherd et al. 1992; To, Roberts et al. 1992; Cagnoni and Shpall 1996; Marques 2000; Delamain 2004). Os leucócitos e o CD34+ são os parâmetros mais utilizados (Haas, Mohle et al. 1994; D'Arena, Musto et al. 1997; D'Arena, Musto et al. 1998; Marques 2000; Delamain 2004).

A circulação aumentada de CD34+ na periferia após mobilização é curta, portanto é fundamental que as leucaféreses sejam realizadas neste período, visando aperfeiçoar a coleta. O pico de células CD34+ é atingido na recuperação da aplasia medular causada pela quimioterapia mielosupressora ou altas doses (Nadir). Após o nadir, quando os leucócitos totais atingem  $1 \times 10^3/\text{uL}$  há grande quantidade de células CD34+ para serem coletadas (D'Arena, Musto et al. 1998). Então recomenda se iniciar as leucaféreses quando os leucócitos atingirem esses valores (Dreger, Marquardt et al. 1993; D'Arena, Musto et al. 1998; Marques 2000; Delamain 2004).

Foi proposto iniciar a coleta de CPPH quando os leucócitos totais atingirem  $1 \times 10^3/\text{uL}$  após nadir e o CD34+ no sangue periférico for  $\geq 20\mu\text{L}$  (Haas, Mohle et al. 1994; D'Arena, Scalzulli et al. 1996; D'Arena, Musto et al. 1997; D'Arena, Musto et al. 1998).

Num estudo com 41 pacientes em 2000 Marques (Marques 2000) e Delamain em 2004 (Delamain 2004) num estudo com 134 pacientes com neoplasias hematológicas demonstraram que com  $1 \times 10^3/\text{uL}$  de leucócitos totais e contagem de CD34+  $\geq 10\mu\text{L}$  no sangue periférico, colhem se CPH suficientes para plena recuperação medular. Ginani e colaboradores em 2011 (Ginani, Seber et al. 2011), também usaram CD34+  $\geq 10\mu\text{L}$  no sangue periférico como parâmetro para iniciar as aféreses com sucesso.

Com isto a determinação diária de CD34+ no sangue periférico, por citometria de fluxo, após o nadir dos leucócitos na mobilização parece ser a melhor opção para estabelecer o melhor momento para início das leucaféreses.

### 1.5.3. Quantidade de células CD34+

Há forte relação entre o número de células CD34+/kg de peso do pacientes infundidas e recuperação medular. Há uma recuperação hematopoiética mais rápida e eficaz quanto maior for o número de células CD34+ administrada (Bensinger, Weaver et al. 1995; Schwella, Siegert et al. 1995; Kroger, Zeller et al. 1999; Marques 2000; Delamain 2004; Nervi, Link et al. 2006).

Por este motivo vários autores sugerem que o número de CD34+ a serem colhidas e posteriormente infundidas seria de  $5 \times 10^6$  CD34+/Kg de peso do paciente, para que ocorra plena reconstituição da MO (Tricot, Jagannath et al. 1995; Perea, Sureda et al. 2001), entretanto alguns centros de transplantes consideram o valor de  $2 \times 10^6$  células CD34+/Kg de peso do paciente adequado para que ocorra a recuperação medular (Gandhi, Jestice et al. 1999; Marques 2000; Delamain 2004; Nervi, Link et al. 2006).

O aceitável é que os valores mínimos de CD34+ fiquem entre  $2 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$ /Kg de peso do paciente para que haja um enxertamento rápido, seguro e eficaz após o TAMO com CPPH (Haas, Mohle et al. 1994; Korbling, Huh et al. 1995; Passos-Coelho, Braine et al. 1995; Tricot, Jagannath et al. 1995; D'Arena, Musto et al. 1998; Gandhi, Jestice et al. 1999; Marques 2000; Perea, Sureda et al. 2001; Delamain 2004; Nervi, Link et al. 2006).



## 2. Objetivos

Avaliar o número de células coletadas de CD34+ para transplante autólogo em pediatria, com o uso de G-CSF na dose de 15µg/kg de peso do paciente e fracionada.

Avaliar se a dose de G-CSF 15µg/kg de peso do paciente e fracionada diminuiria o número de leucaférese realizada para atingir o número mínimo de  $3 \times 10^6$ /kg de peso de células CD34+.

Avaliar a efetividade desta dose quando comparada a dose convencional de 10µg/kg de peso do paciente em dose única.





## 3. Material e Métodos

### 3.1. Material

Foram selecionados para este estudo os pacientes portadores de tumores sólidos ou linfomas de alto grau que após tratamento quimioterápico prévio alcançaram remissão completa ou parcial e tiveram indicação de mobilização e coleta de CPPH através de leucaféreses para a TAMO como consolidação de tratamento oncológico. Todos pacientes foram tratados exclusivamente no Centro Infantil Boldrini (CIB).

Foi um estudo ambispectivo realizado em uma única instituição:

- Análise retrospectiva de pacientes mobilizados com quimioterapia e G-CSF dose única.
- Análise prospectiva de pacientes mobilizados com quimioterapia e G-CSF dose fracionada.

Ampla explicação acerca dos procedimentos de mobilização com G-CSF, leucaférese e coleta de CPPH foi fornecida aos candidatos e/ou aos responsáveis legais. Termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram obtidos de todos os pacientes e/ou responsáveis legais envolvidos, utilizando-se os impressos de acordo com nossa regulamentação institucional (Anexo 1).

Este estudo foi realizado segundo os preceitos da Declaração de Helsinque (2000) e autorizado e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do CIB (01926012.0.0000.5376).

Os pacientes preencheram os seguintes critérios de elegibilidade:

### 3.1.1. Critérios de Inclusão

- Portadores de tumores sólidos: Neuroblastoma (NB) estágio III alto risco ou estágio IV; Tumor de células germinativas (TCG) em 2ª remissão completa ou remissão parcial ou progressão; Meduloblastoma (Medulo) em 2ª remissão completa ou remissão parcial; Sarcoma de Ewing (EWING) metastático em 1ª remissão completa ou remissão parcial.
- Portadores de linfomas: LNH 2ª remissão completa ou remissão parcial e LH 2ª remissão completa ou remissão parcial.
- Ter até 24 anos de idade na indicação de TAMO.
- Pacientes tratados com até quatro esquemas quimioterápicos prévios.
- Mobilizados com quimioterapia e G-CSF.
- Peso igual ou superior a 10 Kg no momento da coleta de CPPH.
- Funções cardíaca, hepática, renais, pulmonares normais.
- *Perfomace status Karnofsky* (para pacientes >16 anos) e *Lansky* (para pacientes ≤ 16 anos) de 60% a 100% (Anexo 2).

### 3.1.2 Critérios de exclusão

- Serem portadores de segunda neoplasia.
- Sorologia positiva para HIV e Hepatite C.
- Hepatite B em atividade.
- Não assinatura do TLCE.

### 3.1.3. Avaliação clínica pré TAMO

- Os dados dos pacientes relativo à data de nascimento, sexo, histórico da doença, resultados laboratoriais e resultados de exames de imagens, definindo o *status* atual da doença de base, foram obtidos a partir do atendimento e/ou do prontuário médico.
- Para definição do *status* da doença de base pré TAMO foi considerado para os portadores de LH: biopsia de medula óssea bilateral, PET-SCAN e estadiamento clínico seguindo a classificação de Ann Arbor (Anexo 3).
- Para definição do *status* da doença de base pré TAMO foi considerado para os pacientes portadores de LNH: biopsia de medula óssea bilateral, PET-SCAN e estadiamento clínico seguindo a classificação de Murphy (Anexo 3).
- Para definição do *status* da doença de base pré TAMO foi considerado para os portadores de NB: biopsia de medula óssea bilateral, tomografias, cariótipo, biologia molecular (PCR) para *N-myc*, cintilografia de corpo inteiro com MIBG e estadiamento clínico seguindo a tabela INSS (Anexo 3).
- Para definição do *status* da doença de base pré TAMO foi considerado para os portadores de TCG: tomografias, coleta sérica de: beta-HCG, alfa-fetoproteína, CA-125, CEA para definição dos locais acometidos.
- Para definição do *status* da doença de base pré TAMO foi considerado para os portadores de Meduloblastoma: ressonância de magnética de crânio, ressonância de magnética de neuroeixo e liquor com pesquisa de células neoplásica para estadiamento clínico.
- Para definição do *status* da doença de base pré TAMO foi considerado para os portadores de EWING: biopsia de medula óssea bilateral, cariótipo, biologia molecular (PCR) para t(11:12), tomografias, cintilografia de corpo inteiro com sestamibi e tecnécio para definição dos locais acometidos.

## 3.2. Métodos

Os pacientes foram divididos em dois grupos denominados 10µg/kg e 15µg/kg.

O grupo 10µg/kg foi formado por pacientes que receberam G-CSF 10µg/kg de peso em dose única, entre dezembro de 1998 a dezembro de 2008.

O grupo 15µg/kg foi formado por pacientes que receberam G-CSF 15µg/kg de peso e fracionada\*, entre agosto de 2010 a abril de 2013.

\*10µg/kg de peso às 6h e 5µg/kg de peso às 18h

### 3.2.1 Quimioterapia de mobilização:

As quimioterapias de mobilização (EQM) administradas neste estudo foram divididas em dois grupos: grupo A e grupo B.

O grupo A foi composto por quimioterápicos associados ao quimioterápico ciclofosfamida.

O grupo B foi composto por quimioterápicos sem associação ao quimioterápico ciclofosfamida.

#### Grupo A

Constituídos pelos esquemas:

1. Ciclofosfamida (CY) – Ciclofosfamida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia.
2. Topotecan e ciclofosfamida (Topo/CY) - Topotecan 0,75mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias e ciclofosfamida 250mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias.
3. Ciclofosfamida e etoposida (CY/Vp-16) - Ciclofosfamida 4-7g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e etoposida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia.

4. Ciclofosfamida, metotrexato e etoposida (CY/MTX/Vp-16) – Ciclofosfamida  $4-7\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 1 dia, metotrexato  $8\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 1 dia e etoposida  $4\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 1 dia.
5. Ciclofosfamida e Adriamicina (CY/Adria) - Ciclofosfamida  $2,4\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 2 dias e adriamicina  $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 3 dias.

### **Grupo B:**

Constituído pelos esquemas:

1. Ifosfamida, carboplatina e etoposida (ICE) - Ifosfamida  $3\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 3 dias, carboplatina  $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 1 dias e etoposida  $150\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 3 dias.
2. Taxol, ifosfamida e cisplatina (TIP) - Taxol  $175\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 1 dia, ifosfamida  $1,2\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 5 dias e cisplatina  $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 5 dias.
3. Ifosfamida, cisplatina, etoposida e doxorrubicina (IFO/P/DOXO/Vp-16) - Ifosfamida  $2,5\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 5 dias, cisplatina  $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 4 dias, doxorrubicina  $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 4 dias e etoposida  $125\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 4 dias.
4. Dexametasona, citarabina e cisplatina (DHAP) - Dexametasona  $40\text{mg}/\text{dia}$  x 4 dias, citarabina  $400\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 1 dia e cisplatina  $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  x 1 dia.

Tanto o grupo A quanto o grupo B são compostos somente por quimioterápicos de administração EV. Com exceção do esquema 2 do grupo A denominado Topo/CY, que foi administrado nos pacientes no ambulatório de quimioterapia, todos os demais esquemas A e B foram administrados nos pacientes internados na unidade de transplante de medula óssea do CIB (unidade transplante).

### 3.2.2. Esquema de G-CSF

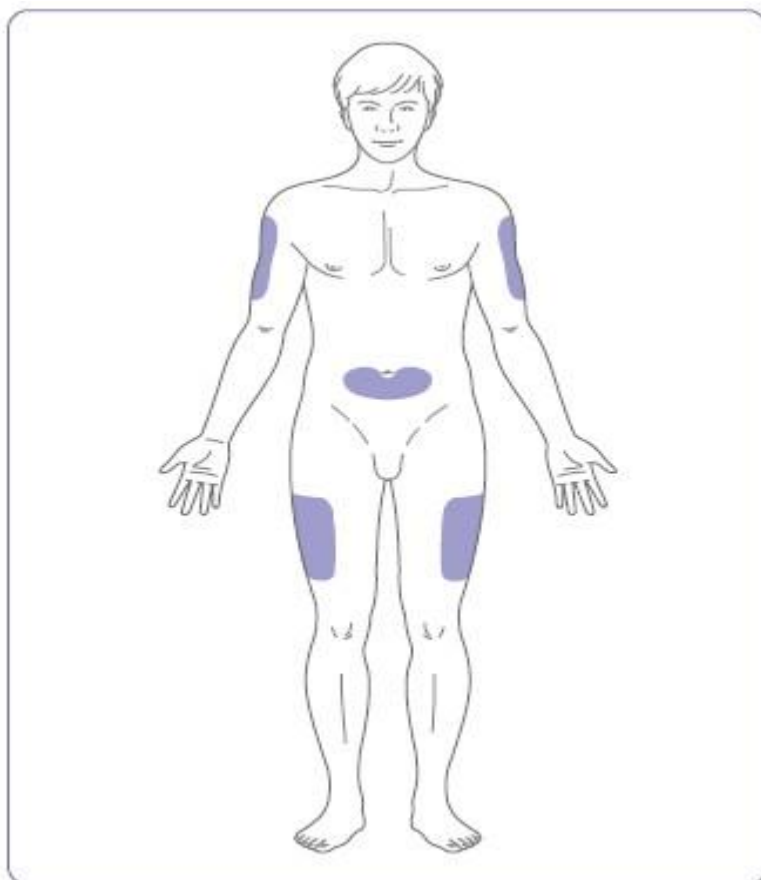
A citocina de escolha para este estudo, para estímulo das células CD34+, foi o G-CSF (filgrastima).

Para os pacientes do sistema de saúde único (SUS) o G-CSF foi retirado, pelo paciente e/ou responsável legal, na farmácia de alto custo da secretária de saúde do estado de São Paulo. Para os pacientes que possuíam convênio médico privado, o G-CSF foi adquirido, pelo setor de compras do CIB, em distribuidores de produtos hospitalares. Foram utilizadas neste estudo, de acordo com a disponibilidade da farmácia de alto custo e das distribuidoras, as seguintes marcas de G-CSF: Granulokine® (Roche, Barueri, SP, BR), Leucin® (Bergamo, São Paulo, SP, BR.) e Filgrastine® (Blausiegel, Cotia, SP, BR).

Neste estudo as aplicações do G-CSF deram início um dia após o término da EQM. O G-CSF foi aplicado SC às 6h, 10µg/kg de peso do paciente em dose única no grupo 10µg/kg e no grupo 15µg/kg aplicado, também via SC, 10µg/kg de peso do paciente às 6h e 5µg/kg de peso do paciente às 18h e foi mantido, em ambos os grupos, até obtenção de  $\geq 3 \times 10^6$ /kg de peso do paciente de CD34+ ou caracterização de falha de mobilização. A falha de mobilização foi determinada pelo insucesso de colher o mínimo estabelecido de  $3 \times 10^6$ /kg de peso do paciente de células de CD34+. Nos dois grupos, as aplicações de G-CSF SC foram realizadas na região periumbilical (abdômen) ou na região posterior dos braços (tríceps) ou na face anterior das coxas (quadríceps). A escolha de qual local seria realizado as aplicações de G-CSF SC, dentre as três regiões, ficou a cargo dos pacientes ou responsáveis legais.

Se o local escolhido, pelo paciente ou responsável legal, apresentou alguma alteração, por exemplo, edema, equimose, hematoma, aumento de temperatura local ou saída de secreções, este local

deixou de ser utilizado e iniciou se um rodízio entre as três regiões de aplicação do G-CSF SC. Todos os pacientes receberam as aplicações de G-CSF SC internados na unidade de transplante.



**Figura 3: Locais de aplicação do G-CSF**

### **3.2.3. Acesso Vascular**

Todo paciente, neste estudo, antes de iniciar o EQM e as leucaféreses de grande volume (LVL) recebeu um cateter venoso central de duas vias não totalmente implantável. O cateter utilizado foi o cateter tipo Hickman® (BARD, Atlanta, GA, USA) nos pacientes até 30 kg de peso o tamanho do

cateter foi de 12F, nos pacientes acima de 30 kg de peso o cateter utilizado foi o de 13,5F. O cateter de Hickman® foi implantado pela cirurgia pediátrica sob sedação anestésica no centro cirúrgico do CIB.



**Figura 4: Cateter de Hickman®**

#### **3.2.4. Leucaférese de grande volume (LVL)**

As LVL foram realizadas em um separador celular automático de fluxo contínuo (separador celular) com anticoagulante ACD-A fórmula A (ACD). O ACD é composto por: Citrato de sódio 2H<sub>2</sub>O: 22g/l, Glicose H<sub>2</sub>O: 24,5g/l e Ácido cítrico: 7,3g/l, e foi infundido em proporção de 1:10 em relação ao sangue retirado, sendo esta proporção reduzida durante o procedimento até 1:16.

Neste estudo foram usando os seguintes separadores celulares: CS3000 Plus® (Fenwall Laboratories, Deerfield, IL, USA), Cobe-spectra® (Gambro BCT, Lakewood, CO, USA) e Com.tec® (Fresenius Kabi, Barueri, SP, BR). A escolha do separador celular a ser utilizado na realização das



LVL foi determinada pela disponibilidade dos mesmos no banco de sangue do CIB. Detalhes do funcionamento dos separadores celulares no anexo 4.

Como critério para iniciar se a primeira LVL, após nadir do EQM, estabeleceu se para o grupo 15µg/kg que ocorreria com leucócitos  $\geq 1 \times 10^3/\text{uL}$  e CD34+ no sangue periférico  $\geq 10\mu\text{L}$ . A primeira LVL do grupo 10µg/kg ocorreria, também após nadir do EQM, somente com leucócitos  $\geq 1 \times 10^3/\text{uL}$ .

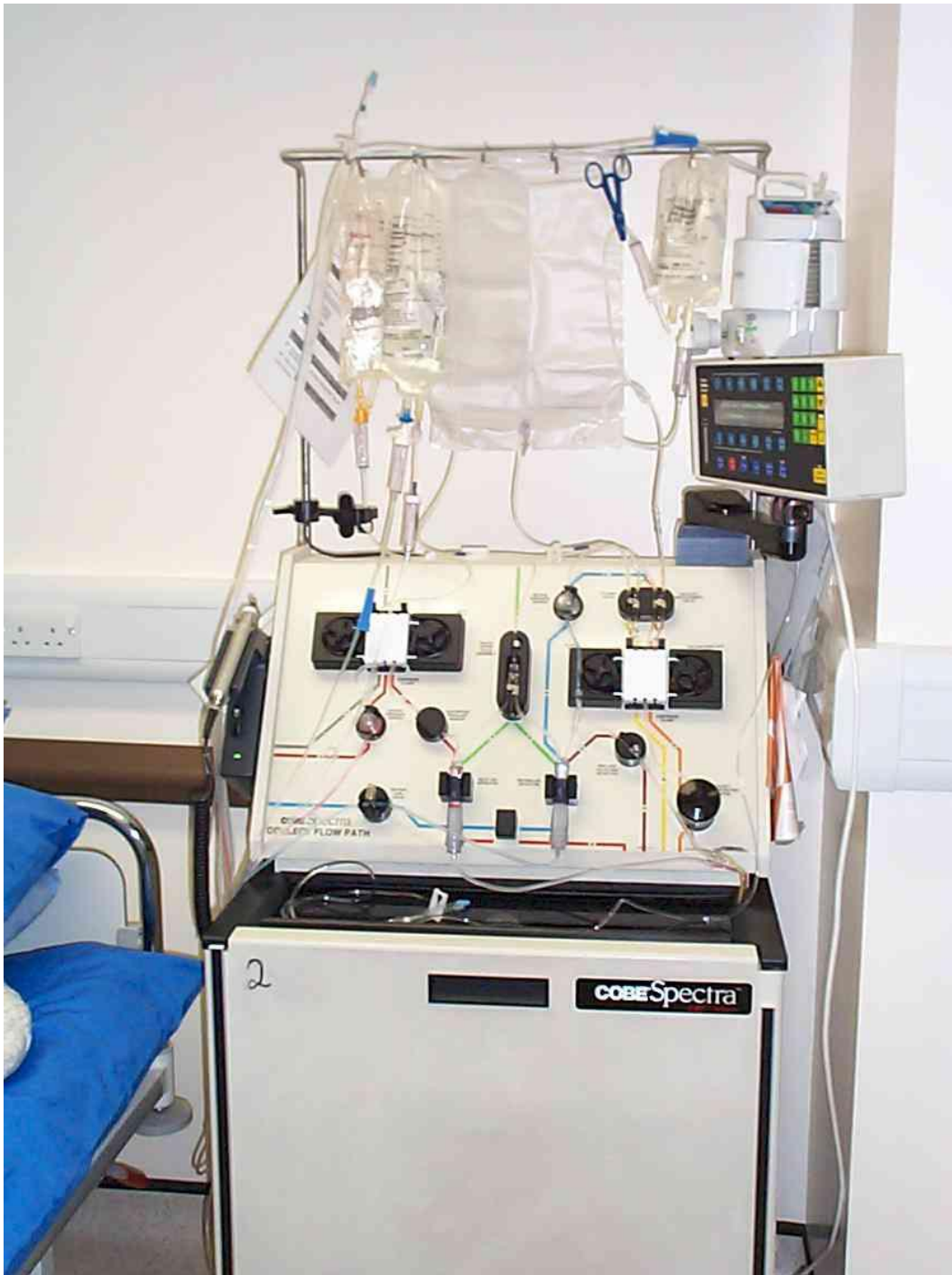
Todos os pacientes receberam durante LVL soro glicosado 5% via EV contendo: Gluconato de cálcio 10%, Sulfato de magnésio 10%, Cloreto de sódio 20% e Cloreto de potássio 19,1%. Também durante LVL os pacientes estavam sob monitorização de multiparâmetros não invasivos (frequência cardíaca [FC], pressão arterial sistêmica [PAS] e saturação de oxigênio [S02]). Qualquer alteração nesses parâmetros interrompeu a LVL imediatamente.

As LVL iniciarem se sempre às 12h. Foram processadas 4 volemiás por LVL. O fluxo sanguíneo de retirada variou de 60 a 100 ml por minuto, dependendo do conforto do paciente e condições do cateter. O ACD no sistema do separador celular pode causar hipocalcemia. Durante o procedimento de LVL, caso o paciente apresentasse sintomas e/ou sinais de hipocalcemia, seria administrado via EV Gluconato de cálcio 10% na dose de 0,2 ml/kg de peso. Se o paciente não atingisse o número de células CD34+ mínimo,  $3 \times 10^6/\text{kg}$  de peso do paciente, na primeira LVL, deveria ser submetido a outro procedimento no dia seguinte, independentemente do número de leucócitos e CD34+ no sangue periférico, com limite de mais duas LVL no grupo 15µg/kg e sem limite de LVL no grupo 10µg/kg.

Todo paciente com peso entre  $\geq 10$  a  $< 20$  kg recebeu como *priming* durante LVL concentrado de hemácias filtradas e irradiadas\* (CHFI) na quantidade de 20 ml/kg de peso, para garantir a manutenção da volemia. Todo paciente que apresentava pré LVL com *priming* hemoglobina (Hb)  $< 8,0$  g/dL, ao fim do procedimento o CHFI foi devolvido.

Caso os pacientes menores de 3 anos de idade, permanecessem agitados durante o procedimento, poderia ser aceito o uso de Hidrato de cloral 20% (200mg/ml) 50 a 100mg/kg de peso VO. Dose preconizada pelo o manual de procedimentos da unidade de terapia intensiva (UTI) do CIB.

\* Componentes irradiados com 20 Gy de acordo com o protocolo do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), adotado pelo CIB.



**Figura 5: Separador celular automático de fluxo contínuo**

### **3.2.4.1. Controle laboratorial após LVL**

#### **3.2.4.1.1. Hb e plaquetas pós LVL**

Após cada LVL foi realizado dosagem de sérica de Hb e plaquetas. Foi estabelecido que transfusões de concentrado de plaquetas filtradas e irradiadas\* (CPFI) e CHFI ocorreriam profilaticamente quando o número de plaquetas fosse  $<10 \times 10^3/\mu\text{L}$  e o Hb  $<8,0\text{g/dL}$ . Se o paciente apresentasse instabilidade hemodinâmica e/ou sangramento após LVL, seriam transfundidos com CPFI e/ou CHFI independentemente dos valores de plaquetas e Hb encontrados pós LVL.

O equipamento utilizado para dosagem sérica de Hb e plaquetas foi o contador automático para hemograma SYSMEX® XS 1000i (Roche, Barueri, SP, BR).

\* Componentes irradiados com 20 Gy de acordo com o protocolo do Hemocentro da UNICAMP, adotado pelo CIB.

#### **3.2.4.1.2. Dosagem sérica de eletrólitos após LVL**

Ao fim de cada LVL do grupo  $15\mu\text{g/kg}$  foi colhido dosagem sérica de cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (Pi), sódio (Na) e potássio (K). Reposição via EV foi realizada todas as vezes que os níveis dos eletrólitos estavam abaixo dos parâmetros de normalidade, independentemente de sintomatologia. Foram utilizados os parâmetros de normalidades do laboratório de análise clínicas do CIB: Ca 8,4 a  $10,0\text{mg/dL}$ , Mg 1,61 a  $2,61\text{mg/dL}$ , Pi 2,7 a  $4,5\text{mg/dL}$ , Na 136 a  $145\text{mEq/L}$  e K 3.5 a  $5.1\text{mEq/L}$ . As reposições seguiram o preconizado no manual de procedimentos da UTI do CIB.

Os eletrólitos foram dosados no equipamento COBAS® Integra 400 plus (Roche, Barueri, SP, BR). O grupo  $10\mu\text{g/kg}$  não realizou coleta de eletrólitos pós LVL.

### 3.2.5. Cuidados de suporte

Durante EQM todos pacientes receberam soro glicosado 5% (3000ml/m<sup>2</sup>) via EV contendo: Gluconato de cálcio 10%, Sulfato de magnésio 10%, Cloreto de sódio 20% e Cloreto de potássio 19,1%, e antieméticos via EV (metoclopramida, ondansetrona e dimenidrinato).

Paciente que apresentou mucosite do trato gastro intestinal (TGI) após EQM foi prescrito morfina 0,07 a 0,15mg/kg de peso do paciente de 4/4h e bochechos em cavidade oral com soro fisiológico 0,9% 10ml gelado, livre demanda.

Na neutropenia febril, após EQM, foram colhidas hemoculturas do sangue periférico e das duas vias do cateter de Hickman®, e prescrito cefepima via EV 8/8h (pacientes com < 40 kg de peso 50mg/kg/dose e 2,0g/dose pacientes com ≥ 40 kg de peso), vancomicina via EV 6/6h (pacientes com < 40 kg de peso 10mg/kg/dose e 500mg/dose pacientes com ≥ 40 kg de peso). Se após 72h a febre persistiu ou positividade de hemocultura, foram trocados os antibióticos ou ajustado de acordo com o antibiograma do agente isolado. Caso o paciente permanecesse febril por 6 dias, apesar da troca ou ajuste de antibiótico, foi realizada tomografia de corpo inteiro e prescrito anfotericina B desoxicolato 1mg/kg/peso do paciente via EV 1 vez ao dia. Neste estudo não foi utilizado nenhum antibiótico profilático ou antifúngico.

Pacientes em uso de vancomicina e/ou anfotericina B desoxicolato e durante todo período febril tiveram seu número de plaquetas mantidos em ≥ 20x10<sup>3</sup>/uL. Todo paciente que teve seu número de plaquetas <10x10<sup>3</sup>/uL foi transfundido com CPFI, pacientes com ≥ 10 a < 20 kg de peso receberam ¼ de CPFI, ≥ 20 a < 40 kg de peso receberam ½ CPFI e ≥ 40 kg de peso receberam 1 CPFI. Na ocorrência de qualquer fenômeno hemorrágico, independentemente dos números de plaquetas, os pacientes foram transfundidos com CPFI, na realização de procedimentos invasivos se o número de plaquetas estivesse < 50x10<sup>3</sup>/uL, os pacientes também foram transfundidos com CPFI.

Quando o nível de Hb abaixou para  $<8,0\text{g/dL}$ , os pacientes receberam CHFI, paciente com  $\geq 10$  a  $<40$  kg de peso receberam 20 ml/kg de peso do paciente de CHFI, os pacientes com  $\geq 40$  kg de peso receberam 2U CHFI (1U= ~ 400 ml).

### **3.2.6. Análise de CHHP**

A porcentagem de células CD34+ foi determinada por citometria de fluxo, seguindo técnica padrão de Sutherland (Sutherland, Keating et al. 1994). As amostras dos pacientes e dos produtos foram diluídas para obtenção de  $3 \times 10^6$  células e incubadas em tubos Falcon contendo anticorpos monoclonais específicos, durante 30 minutos em câmara escura. A marcação ocorreu adicionando se anticorpo monoclonal CD14+ conjugado a FITC (Bento & Dickinson, San Jose, CA, USA), simultaneamente com anticorpo IgG1 conjugado a PE (Bento & Dickinson, San Jose, CA, USA). No tubo CD34 adicionou se anticorpo monoclonal CD14/FITC e o anticorpo monoclonal CD34HPCA2/P2. Após a incubação, foi adicionada solução tampão lisante de células vermelhas em cada tubo e deixada à temperatura ambiente por 15 minutos, sendo lavadas duas vezes com tampão PBS em centrifuga (Palo Alto, CA, USA) a 1800 rpm por 10 minutos, a células foram suspensas em solução tampão PBS e analisadas no citometro de fluxo BD FacsCalibur® (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

Para a realização do transplante autólogo definiu-se o número mínimo de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  de peso do paciente de células CD34+.

### 3.3. Análise estatística

Foi feita análise descritiva de todas as variáveis envolvidas e posteriormente aplicaram-se os testes chi-quadrado ou Fisher, se adequado, nas variáveis categóricas, enquanto nas contínuas aplicou-se o teste t-student para comparar as médias entre os grupos 10µg/kg e 15µg/kg, considerando como significativo o  $p < 0,05$ . O *software* estatístico usado foi SPSS (*Statistical Package Social Sciences*) version 21.0.





## 4. Resultados

Cinquenta e três pacientes receberam 10µg/kg de peso de G-CSF entre dezembro de 1998 a dezembro de 2008, esses pacientes constituíram o grupo denominado grupo 10µg/kg, 14 pacientes foram excluídos da análise: 8 pacientes mobilizaram somente com G-CSF, 1 paciente tinha 29 anos de idade e 5 pacientes apresentaram falha de mobilização.

Entre agosto de 2010 e abril de 2013, 35 pacientes receberam 15µg/kg de peso de G-CSF fracionada, esses pacientes formaram o grupo denominado grupo 15µg/kg, 9 pacientes foram excluídos por apresentarem falha de mobilização.

Foram analisados neste estudo 39 pacientes pertencentes ao grupo 10µg/kg e 26 pacientes pertencentes ao grupo 15µg/kg.

### 4.1. Características dos pacientes

#### 4.1.1. Características dos pacientes do Grupo 10µg/kg

Dos 39 pacientes analisados no grupo 10µg/kg, 25 (64,10%) pacientes eram portadores de linfomas e 14 (35,89%) portadores de tumores sólidos. Vinte e três (58,97) pacientes eram do gênero masculino e 16 (41,02%) pacientes do gênero feminino, 32 (82,05%) pacientes eram da raça branca e 7 (17,94%) pacientes da raça não branca e apresentou mediana de idade de 6,5 anos (1-22 anos).

A mediana do número de ciclos de quimioterapia recebida no grupo 10µg/kg prêmobilização foi de 2 ciclos (1 a 3 ciclos).

Vinte (51,28%) pacientes irradiaram pré-mobilização. A radioterapia não influenciou o número de leucaféreses realizadas e número de células CD34+ coletadas.

As características dos pacientes do grupo 10µg/kg estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1: Características dos pacientes do grupo 10µg/kg**

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo 10µg/kg</b>
<b>Gênero: Masculino - n(%)</b>	23 (58,97)
<b>Feminino - n(%)</b>	16 (41,02)
<b>Raça: Branco - n(%)</b>	32 (82,05)
<b>Não branco - n(%)</b>	07 (17,94)
<b>Idade - mediana / variação</b>	
<b>Grupo</b>	12,0(1-20)
<b>Linfoma</b>	12,5(6-18)
<b>LH</b>	13,0(7-18)
<b>LNH</b>	12,0(6-14)
<b>Tumor sólido</b>	11,0(1-20)
<b>TCG</b>	11,5(1-20)
<b>NB</b>	02,0(1-12)
<b>Medulo</b>	10,0(7-15)
<b>Ewing</b>	10,5(8-13)
<b>Diagnóstico</b>	
<b>Linfoma- n(%)</b>	25(64,10)
<b>LH - n(%)</b>	19(48,71)
<b>LNH - n(%)</b>	06(15,38)
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	14(35,89)
<b>TCG- n(%)</b>	06(15,38)
<b>NB - n(%)</b>	03(7,69)
<b>Medulo - n(%)</b>	03(7,69)
<b>Ewing - n(%)</b>	02(5,12)
<b>Radioterapia – Sim - n(%)</b>	20(51,28)
<b>Linfoma- n(%)</b>	18(46,15)
<b>LH - n(%)</b>	18(46,15)
<b>LNH - n(%)</b>	0
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	02(5,12)
<b>TCG- n(%)</b>	0
<b>NB - n(%)</b>	0
<b>Medulo - n(%)</b>	02(5,12)
<b>Ewing - n(%)</b>	0
<b>Não –n(%)</b>	19(48,72)
<b>Qt prévias - mediana / variação</b>	02(1-3)

Linfomas: LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin; Tumor sólido: TCG: Tumor de células germinativas, NB: Neuroblastoma; Medulo: Meduloblastoma e Ewing: Sarcoma de Ewing. Qt: Ciclos de quimioterapia pré-mobilização.

#### **4.1.2. Características dos pacientes do Grupo 15µg/kg**

Dos 26 pacientes analisados no grupo 15µg/kg, 22 (84,61%) pacientes eram portadores de tumores sólidos e 4 (15,38%) portadores de linfomas. Treze (50%) pacientes eram do gênero masculino e 13 (50%) pacientes do gênero feminino, 20 (76,92%) pacientes eram da raça branca e 6 (23,07%) pacientes da raça não branca e apresentou mediana de idade de 6,5 anos (1-22 anos).

A mediana do número de ciclos de quimioterapia recebida no grupo 15µg/kg pré-mobilização foi de 2 ciclos (1 a 4 ciclos) e cinco (19,23%) pacientes irradiaram pré-mobilização.

As características dos pacientes do grupo 15µg/kg estão descritas na tabela 2.

**Tabela 2: Características dos pacientes do grupo 15µg/kg**

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo 15µg/kg</b>
<b>Gênero: Masculino - n(%)</b>	13(50,0)
<b>Feminino - n(%)</b>	13(50,0)
<b>Raça: Branco - n(%)</b>	20(76,92)
<b>Não branco - n(%)</b>	06(23,07)
<b>Idade - mediana / variação</b>	
<b>Grupo</b>	6,5(1-22)
<b>Linfoma</b>	17,5(1-22)
<b>LH</b>	20(18-22)
<b>LNH</b>	14(11-17)
<b>Tumor sólido</b>	5,5(1-22)
<b>TCG</b>	18,5(15-22)
<b>NB</b>	04(1-15)
<b>Ewing</b>	09(6-11)
<b>Diagnóstico</b>	
<b>Linfoma- n(%)</b>	04(15,38)
<b>LH - n(%)</b>	02(7,69)
<b>LNH - n(%)</b>	02(7,69)
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	22(84,61)
<b>NB - n(%)</b>	14(53,84)
<b>Ewing - n(%)</b>	06(23,0)
<b>TCG- n(%)</b>	02(7,69)
<b>Radioterapia – Sim - n(%)</b>	05(19,23)
<b>Linfoma- n(%)</b>	03(11,53)
<b>LH - n(%)</b>	02(7,69)
<b>LNH - n(%)</b>	01(3,84)
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	02(7,69)
<b>NB - n(%)</b>	01(3,84)
<b>Ewing - n(%)</b>	01(3,84)
<b>TCG- n(%)</b>	0
<b>Não –n(%)</b>	21(80,76)
<b>Qt prévias - mediana / variação</b>	02(1-4)

Linfomas: LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin; Tumor sólido: TCG: Tumor de células germinativas, NB: Neuroblastoma e Ewing: Sarcoma de Ewing. Qt: Ciclos de quimioterapia pré-mobilização.

#### 4.1.3. Comparação entre os pacientes dos grupos 10µg/kg e 15µg/kg

Não há diferença estatística entre os grupos 10µg/kg e 15µg/kg quanto ao gênero ( $p=0,61$ ) e raça ( $p=0,75$ ). O grupo 15µg/kg é estatisticamente mais jovem quanto à idade ( $p=0,01$ ) e também estatisticamente possui maior quantidade de pacientes portadores de tumores sólidos ( $p<0,0001$ ). Os pacientes do grupo 10µg/kg irradiaram mais pré-mobilização que o grupo 15µg/kg, com diferença estatística ( $p<0,01$ ). Devido ao número muito pequeno de pacientes irradiados no grupo 15µg/kg não foi possível comparar se esta diferença estatística influenciou o número de leucaféreses realizadas e o número de células CD34+ coletadas entre os grupos.

Entre os grupos não há diferença estatística ( $p=0,30$ ) quanto ao número de ciclos de quimioterapia recebido pré-mobilização, e o número de quimioterapias recebidas não influenciou o número de leucaféreses realizadas e o número de células CD34+ coletadas.

As características dos pacientes do grupo 10µg/kg e 15µg/kg grupo estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3: Características dos pacientes dos grupos 10µg/kg e grupo 15µg/kg**

Variáveis	Grupo 10µg/kg	Grupo 15µg/kg	p-value
<b>Gênero: Masculino - n(%)</b>	23 (58,97)	13(50,0)	<i>p=0,61</i>
<b>Feminino - n(%)</b>	16 (41,02)	13(50,0)	
<b>Raça: Branco - n(%)</b>	32 (82,05)	20(76,92)	<i>p=0,75</i>
<b>Não branco - n(%)</b>	07 (17,94)	06(23,07)	
<b>Idade - mediana / variação</b>			<i>p=0,01</i>
<b>Grupo</b>	12,0(1-20)	6,5(1-22)	
<b>Linfoma</b>	12,5(6-18)	17,5(1-22)	
<b>LH</b>	13,0(7-18)	20(18-22)	
<b>LNH</b>	12,0(6-14)	14(11-17)	
<b>Tumor sólido</b>	11,0(1-20)	5,5(1-22)	
<b>TCG</b>	11,5(1-20)	18,5(15-22)	
<b>NB</b>	02,0(1-12)	04(1-15)	
<b>Medulo</b>	10,0(7-15)	0	
<b>Ewing</b>	10,5(8-13)	09(6-11)	
<b>Diagnóstico</b>			<i>p&lt;0,0001</i>
<b>Linfoma- n(%)</b>	25(64,10)	04(15,38)	
<b>LH - n(%)</b>	19(48,71)	02(7,69)	
<b>LNH - n(%)</b>	06(15,38)	02(7,69)	
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	14(35,89)	22(84,61)	
<b>TCG- n(%)</b>	06(15,38)	02(7,69)	
<b>NB - n(%)</b>	03(7,69)	14(53,84)	
<b>Medulo - n(%)</b>	03(7,69)	0	
<b>Ewing - n(%)</b>	02(5,12)	06(23,0)	
<b>Radioterapia – Sim - n(%)</b>	20(51,28)	05(19,23)	<i>p&lt;0,01</i>
<b>Linfoma- n(%)</b>	18(46,15)	03(11,53)	
<b>LH - n(%)</b>	18(46,15)	02(7,69)	
<b>LNH - n(%)</b>	0	01(3,84)	
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	02(5,12)	02(7,69)	
<b>TCG- n(%)</b>	0	0	
<b>NB - n(%)</b>	0	01(3,84)	
<b>Medulo - n(%)</b>	02(5,12)	0	
<b>Ewing - n(%)</b>	0	01(3,84)	
<b>Não –n(%)</b>	19(48,72)	21(80,76)	
<b>Qt prévias - mediana / variação</b>	02(1-3)	02(1-4)	<i>p=0,30</i>

Linfomas: LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin; Tumor sólido: TCG: Tumor de células germinativas, NB: Neuroblastoma; Medulo: Meduloblastoma e Ewing: Sarcoma de Ewing. Qt: Ciclos de quimioterapia pré-mobilização.

## 4.2. EQM

### 4.2.1. EQM administrados no grupo 10µg/kg

Vinte e três (58,97%) pacientes do grupo 10µg/kg receberam o grupo A e 16 (41,02%) pacientes receberam o grupo B.

A de distribuição dos EQM administrado no grupo 10µg/kg está descrita na tabela 4.

**Tabela 4: EQM administrados no grupo 10µg/kg**

<b>EQM</b>	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>
<b>Total n(%)</b>	23(58,97)	16 (41,02)
<b>Diagnóstico</b>		
<b>Linfoma- n(%)</b>	19(48,71)	06(15,38)
<b>LH - n(%)</b>	14(35,89)	05(12,82)
<b>LNH - n(%)</b>	05(12,82)	01(2,56)
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	04(10,25)	10(25,64)
<b>TCCG- n(%)</b>	0	06(15,38)
<b>NB - n(%)</b>	0	03(7,69)
<b>Medulo - n(%)</b>	02(5,12)	01(2,56)
<b>Ewing - n(%)</b>	02(5,12)	0

**EQM: esquema quimioterápico de mobilização.**

**Grupo A:** CY (ciclofosfamida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia), Topo/CY (Topotecan 0,75mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias e ciclofosfamida 250mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias), Ciclo/Vp-16 (ciclofosfamida 4-7g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e etoposida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia), Ciclo/MTX/Vp-16 (ciclofosfamida 4-7g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia, metotrexato 8g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e etoposida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia) e Ciclo/Adria (ciclofosfamida 2,4g/m<sup>2</sup>/dia x 2 dias e adriamicina 20mg/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias) **Grupo B:** ICE (ifosfamida 3g/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias, carboplatina 500mg/m<sup>2</sup>/dia x 2 dias e etoposida 150mg/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias), TIP (Taxol 175mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia, ifosfamida 1,2g/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias e cisplatina 20mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias), IFO/Vp-16 (ifosfamida 2,5g/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias, cisplatina 40mg/m<sup>2</sup>/dia x 4 dias, doxorubicina 10mg/m<sup>2</sup>/dia x 4 dias e etoposida 125mg/m<sup>2</sup>/dia x 4 dias), DHAP (dexametasona 40mg/dia x 4 dias, citarabina: 400mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e cisplatina 100mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia).

#### 4.2.2. EQM do grupo 15µg/kg

Vinte e dois (84,61%) pacientes do grupo 15µg/kg receberam o grupo A e 4 (15,38%) pacientes receberam o grupo B.

A distribuição dos EQM administrado no grupo 15µg/kg está descrita na tabela 5.

**Tabela 5: EQM administrados no grupo 15µg/kg**

<b>EQM</b>	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>
<b>Total n(%)</b>	22(84,61)	04 (15,38)
<b>Diagnóstico</b>		
<b>Linfoma- n(%)</b>	03(11,53)	01(3,84)
<b>LH - n(%)</b>	02(7,69)	0
<b>LNH - n(%)</b>	01(3,84)	01(3,84)
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	19(73,07)	03(11,53)
<b>TCG- n(%)</b>	0	02(7,69)
<b>NB - n(%)</b>	13(50,00)	01(3,84)
<b>Medulo - n(%)</b>	0	0
<b>Ewing - n(%)</b>	06(23,07)	0

**EQM: esquema quimioterápico de mobilização.**

**Grupo A:** CY (ciclofosfamida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia), Topo/CY (Topotecan 0,75mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias e ciclofosfamida 250mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias), Ciclo/Vp-16 (ciclofosfamida 4-7g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e etoposida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia), Ciclo/MTX/Vp-16 (ciclofosfamida 4-7g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia, metotrexato 8g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e etoposida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia) e Ciclo/Adria (ciclofosfamida 2,4g/m<sup>2</sup>/dia x 2 dias e adriamicina 20mg/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias). **Grupo B:** ICE (ifosfamida 3g/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias, carboplatina 500mg/m<sup>2</sup>/dia x 2 dias e etoposida 150mg/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias), TIP (Taxol 175mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia, ifosfamida 1,2g/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias e cisplatina 20mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias), IFO/Vp-16 (ifosfamida 2,5g/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias, cisplatina 40mg/m<sup>2</sup>/dia x 4 dias, doxorubicina 10mg/m<sup>2</sup>/dia x 4 dias e etoposida 125mg/m<sup>2</sup>/dia x 4 dias), DHAP (dexametasona 40mg/dia x 4 dias, citarabina: 400mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e cisplatina 100mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia).



#### 4.2.3. Comparação dos EQM entre os grupos 10µg/kg e 15µg/kg

O grupo A e o grupo B foram muito bem tolerados pelos pacientes dos grupos 10µg/kg e do grupo 15µg/kg. Nenhum EQM nos grupos 10µg/kg e 15µg/kg, teve sua administração suspensa.

No grupo 15µg/kg foi mais administrado o grupo A, com diferença estatística ( $p=0,03$ ), entretanto esta diferença estatística não influenciou o número de leucaféreses realizadas e o número de células CD34+ coletadas.

A distribuição dos EQM administrado nos grupos 10µg/kg e 15µg/kg estão descrita na tabela 6.

**Tabela 6: EQM administrados nos grupo 10µg/kg e 15µg/kg**

EQM	Grupo 10µg/kg		Grupo 15µg/kg		p-value
	Esquema A	Esquema B	Esquema A	Esquema B	
<b>Total n(%)</b>	23(58,97)	16 (41,02)	22(84,61)	04 (15,38)	$P=0,03$
<b>Diagnóstico</b>					
<b>Linfoma- n(%)</b>	19(48,71)	06(15,38)	03(11,53)	01(3,84)	
<b>LH - n(%)</b>	14(35,89)	05(12,82)	02(7,69)	0	
<b>LNH - n(%)</b>	05(12,82)	01(2,56)	01(3,84)	01(3,84)	
<b>Tumor sólido- n(%)</b>	04(10,25)	10(25,64)	19(73,07)	03(11,53)	
<b>TCG- n(%)</b>	0	06(15,38)	0	02(7,69)	
<b>NB - n(%)</b>	0	03(7,69)	13(50,00)	01(3,84)	
<b>Medulo - n(%)</b>	02(5,12)	01(2,56)	0	0	
<b>Ewing - n(%)</b>	02(5,12)	0	06(23,07)	0	

**EQM: esquema quimioterápico de mobilização.**

**Grupo A:** CY (ciclofosfamida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia), Topo/CY (Topotecan)0,75mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias e ciclofosfamida 250mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias, Ciclo/Vp-16 (ciclofosfamida 4-7g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e etoposida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia), Ciclo/MTX/Vp-16 (ciclofosfamida 4-7g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia, metotrexato 8g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e etoposida 4g/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia) e Ciclo/Adria (ciclofosfamida 2,4g/m<sup>2</sup>/dia x 2 dias e adriamicina 20mg/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias). **Grupo B:** ICE (ifosfamida 3g/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias, carboplatina 500mg/m<sup>2</sup>/dia x 2 dias e etoposida 150mg/m<sup>2</sup>/dia x 3 dias), TIP (Taxol 175mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia ifosfamida 1,2g/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias e cisplatina 20mg/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias), IFO/Vp-16 (ifosfamida 2,5g/m<sup>2</sup>/dia x 5 dias, cisplatina 40mg/m<sup>2</sup>/dia x 4 dias, doxorubicina 10mg/m<sup>2</sup>/dia x 4dias e etoposida 125mg/m<sup>2</sup>/dia x 4 dias), DHAP (dexametasona 40mg/dia x 4 dias, citarabina: 400mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia e cisplatina 100mg/m<sup>2</sup>/dia x 1 dia).

### **4.3. G-CSF**

Todos os pacientes toleraram bem as aplicações do G-CSF, nenhuma aplicação foi suspensa ou reduzida, tanto no grupo 10µg/kg quanto no grupo 15µg/kg. Nenhum paciente, de ambos os grupos, apresentaram hematomas e/ou edemas nos locais de aplicações SC do G-CSF. Cinco (12,82%) pacientes do grupo 10µg/kg e 2 (7,69%) do grupo 15µg/kg apresentaram dor óssea leve durante o uso de G-SCF.

### **4.4. Acesso Vascular**

Nenhum paciente, tanto do grupo 10µg/kg quanto do grupo 15µg/kg, apresentaram complicações na colocação do cateter de Hickman®.

Quatro (6,15%) pacientes tiveram mau funcionamento do cateter de Hickman® durante a LVL. Um (2,56%) paciente do grupo 10µg/kg e 1 (3,84%) paciente do grupo 15µg/kg tiveram o tempo da LVL prolongado, devido ao mau funcionamento do cateter. Dois (7,69%) pacientes do grupo 15µg/kg, não conseguiram coletar o mínimo  $3 \times 10^6$ /kg de peso de células CD34+ por mau funcionamento do cateter acoplado a máquina de aférese.

Os pacientes que tiveram o tempo de LVL prolongado não apresentaram nenhuma complicação, nem mesmo sinal e/ou sintoma de hipocalcemia.

## 4.5. LVL

### 4.5.1. LVL do grupo 10µg/kg

Cento e dez LVL foram realizadas no grupo 10µg/kg, com mediana de 3 LVL (1-7 LVL) realizadas, coletando se uma mediana de  $5,79 \times 10^6/\text{kg}$  ( $0,3-45 \times 10^6/\text{kg}$ ) de células CD34+.

A tabela 7 mostra as LVL realizadas no grupo 10µg/kg.

**Tabela 7: LVL realizadas no grupo 10µg/kg**

LVL	1 LVL	2 LVL	3 LVL	4 LVL	5 LVL	7 LVL
<b>Pacientes- n(%)</b>	4(10,25%)	15(38,46%)	10(25,64%)	6(15,38%)	3(7,69%)	1(2,56%)
<b>LH- n(%)</b>	2(5,12%)	10(25,64%)	5(12,80%)	2(5,12%)		
<b>LNH- n(%)</b>		2(5,12%)	2(5,12%)	2(5,12%)		
<b>TCG- n(%)</b>	1(2,56%)	2(5,12%)	1(2,56%)	1(2,56%)	1(2,56%)	
<b>NB - n(%)</b>		1(2,56%)			1(2,56%)	1(2,56%)
<b>Medulo - n(%)</b>	1(2,56%)		1(2,56%)		1(2,56%)	
<b>Ewing(%)</b>			1(2,56%)	1(2,56%)		

LVL: Leucaféreses de grande volume; 1 LVL: Uma LVL realizada; 2 LVL: Duas LVL realizadas; 3 LVL: Três LVL realizadas; 4 LVL: Quatro LVL realizadas; 5 LVL: Cinco LVL realizadas e 7 LVL: Sete LVL realizadas; Linfomas: LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin; Tumor sólido: TCG: Tumor de células germinativas, NB: Neuroblastoma; Medulo: Meduloblastoma e Ewing: Sarcoma de Ewing.

No grupo 10µg/kg, nenhum paciente apresentou complicações durante a leucaférese, não observado hipovolemia nas crianças com peso < 20 kg e 2 (5,12%) pacientes apresentaram parestesia leve durante LVL.

Quinze (38,46%) pacientes do grupo 10µg/kg apresentavam plaquetas  $<50 \times 10^3/\text{uL}$  préleucaférese, não observado, nesses pacientes, nenhum tipo de sangramento ocorreu durante ou após LVL.

Nenhum paciente deste grupo recebeu CPFI ou CHFI pósleucaférese e três (7,69%) pacientes receberam *priming* de CHFI durante leucaférese. O tempo médio de duração das LVL foi de 4h (2 às 6h).

#### 4.5.2. LVL grupo 15µg/kg

Trinta e seis LVL foram realizadas no grupo 15µg/kg, com mediana de 1 LVL (1-3 LVL) realizada, coletando se uma mediana de células CD34+ de  $4,40 \times 10^6/\text{kg}$  ( $0,6-27,8 \times 10^6/\text{kg}$ ).

A tabela 8 mostra as LVL realizadas no grupo 15µg/kg.

**Tabela 8: LVL realizadas no grupo 15µg/kg**

LVL	1 LVL	2 LVL	3 LVL
<b>Pacientes- n(%)</b>	17(65,38%)	8(30,76%)	1(3,84%)
<b>LH- n(%)</b>	1(3,84%)	1(3,84%)	
<b>LNH- n(%)</b>	2(7,56%)		
<b>TCG- n(%)</b>	1(3,84%)	1(3,84%)	
<b>NB - n(%)</b>	12(46,15%)	2(7,69%)	
<b>Ewing - n(%)</b>	1(2,56%)	4(15,38%)	1(3,84%)

Leucaféreses de grande volume; 1 LVL: Uma LVL realizada; 2 LVL: Duas LVL realizadas e 3 LVL: Três LVL realizadas; Linfomas: LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin; Tumor sólido: TCG: Tumor de células germinativas, NB: Neuroblastoma; Medulo: Meduloblastoma e Ewing: Sarcoma de Ewing.

No grupo 15µg/kg, nenhum paciente apresentou complicações durante a leucaférese, não observado hipovolemia nas crianças com peso < 20 kg e nenhum paciente apresentou parestesia durante LVL.

Dezessete (65,38%) pacientes do grupo 15µg/kg apresentavam plaquetas <50x10<sup>3</sup>/uL préleucaférese, nenhum tipo de sangramento ocorreu durante ou após a LVL e apenas 1 (3,84%) paciente recebeu CPFI após LVL.

Nenhum paciente deste grupo recebeu CHFI pósleucaférese, 11 (42,30%) pacientes receberam *priming* de CHFI durante leucaférese e 5 (19,23%) pacientes repuseram Ca EV após LVL. O tempo médio de duração das LVL foi de 4h (2 às 6h).

Um (3,84%) paciente deste grupo teve sua 2<sup>a</sup> LVL interrompida devido ao mau funcionamento do separador celular.

#### **4.5.3. Comparação das LVL entre os grupos 10µg/kg e 15µg/kg**

Cento e quarenta e seis LVL foram realizadas neste estudo, 110 LVL no grupo 10µg/kg e 36 LVL no grupo 15µg/kg. Nos grupos 10µg/kg e 15µg/kg, nenhuma criança < 3 anos de idade recebeu Hidrado de Cloral 20% durante LVL.

A tabela 9 mostra as LVL realizadas no grupo 10µg/kg e 15µg/kg.

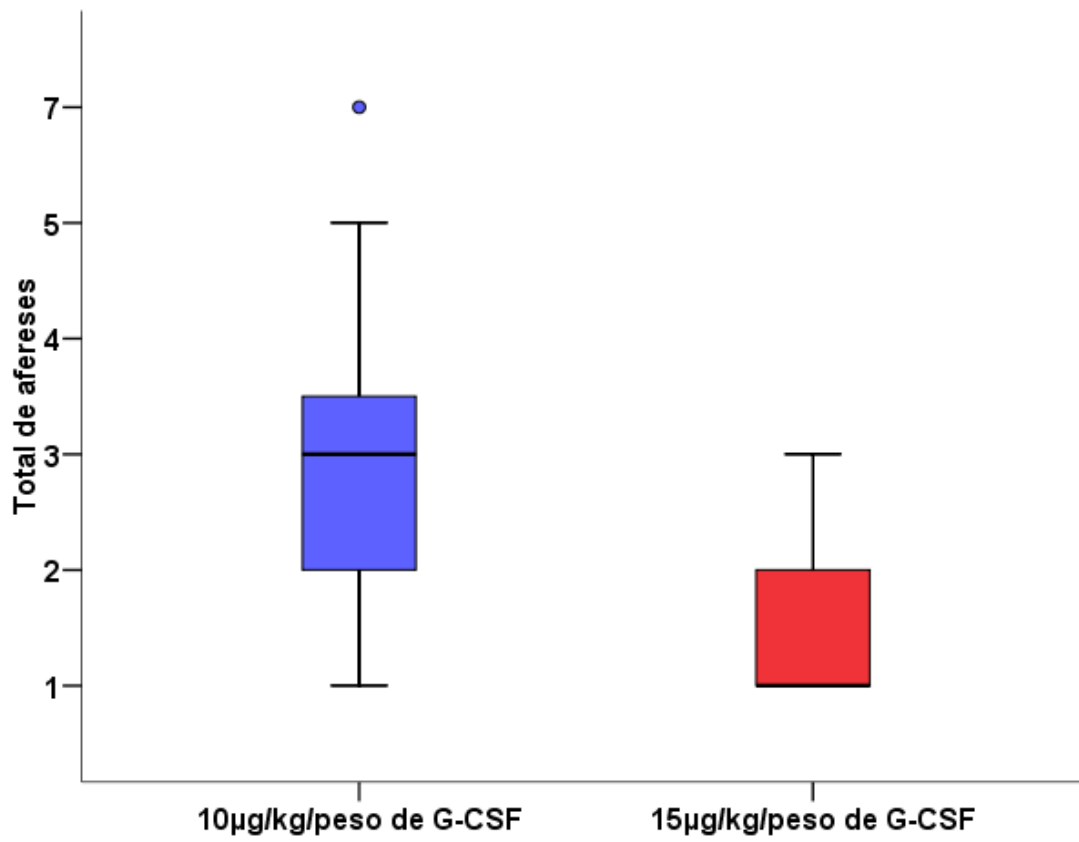
**Tabela 9: LVL realizadas nos grupos 10µg/kg e 15µg/kg**

<b>LVL</b>	<b>1 LVL</b>	<b>2 LVL</b>	<b>3 LVL</b>	<b>4 LVL</b>	<b>5 LVL</b>	<b>7 LVL</b>
<b>Pacientes- n(%)</b>	21(32,30%)	23(35,38%)	11(16,92%)	6(9,23%)	3(4,61%)	1(1,53%)
<b>LH- n(%)</b>	3(4,61%)	11(16,92%)	5(7,69%)	2(3,07%)		
<b>LNH- n(%)</b>	2(3,07%)	2(3,07%)	2(3,07%)	2(3,07%)		
<b>TCG- n(%)</b>	2(3,07%)	3(4,61%)	1(1,53%)	1(1,53%)	1(1,53%)	
<b>NB - n(%)</b>	12(18,46%)	3(4,61%)			1(1,53%)	1(1,53%)
<b>Medulo - n(%)</b>	1(1,53%)		1(1,53%)		1(1,53%)	
<b>Ewing - n(%)</b>	1(1,53%)	4(6,15%)	2(3,07%)	1(1,53%)		

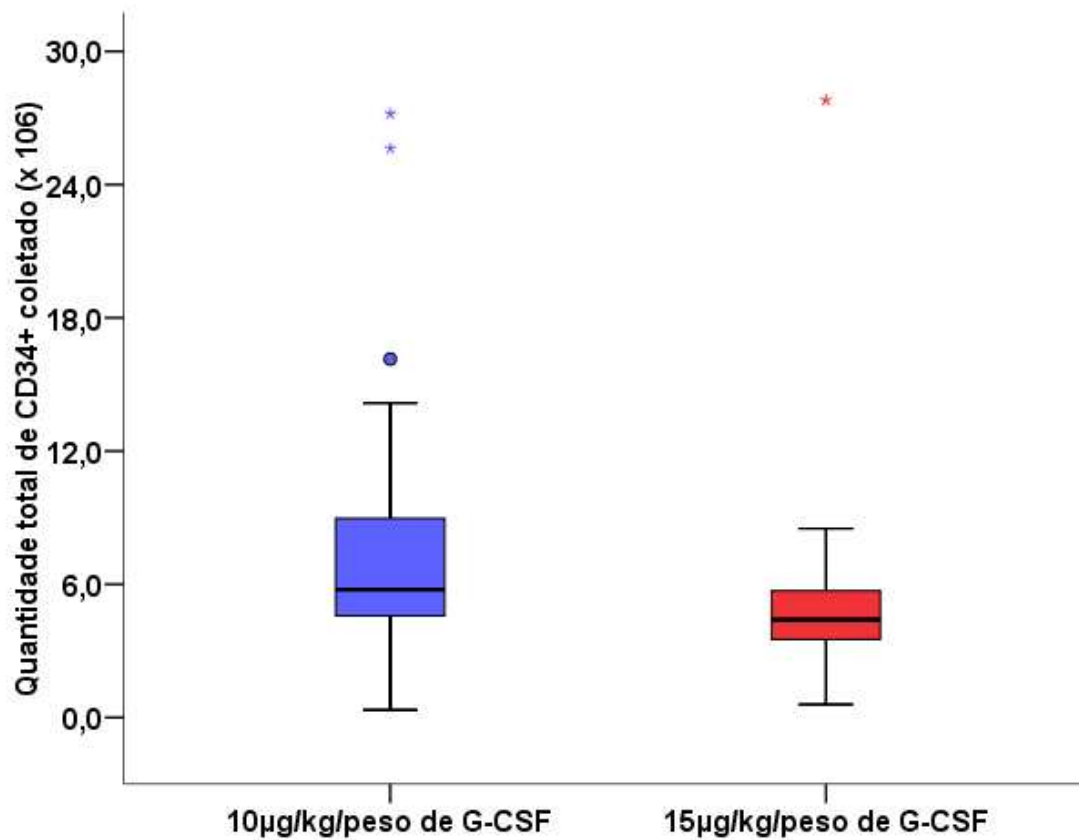
LVL: Leucaféreses de grande volume; 1 LVL: Uma LVL realizada; 2 LVL: Duas LVL realizadas; 3 LVL: Três LVL realizadas; 4 LVL: Quatro LVL realizadas; 5 LVL: Cinco LVL realizadas e 7 LVL: Sete LVL realizadas; Linfomas: LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin; Tumor sólido: TCG: Tumor de células germinativas, NB: Neuroblastoma; Medulo: Meduloblastoma e Ewing: Sarcoma de Ewing.

Quando comparamos os grupos, encontramos diferença estatística no número de LVL realizadas ( $p < 0,0001$ ), o grupo 15µg/kg realizou menos LVL que o grupo 10µg/kg, no número de células CD34+ coletadas ( $p = 0,02$ ), o grupo 15µg/kg coletou mais células CD34+ que o grupo 10µg/kg (Figuras 6 e 7).

Quinze (38,46%) pacientes do grupo 10µg/kg e 17 (65,38%) pacientes do grupo 15µg/kg apresentavam plaquetas  $< 50 \times 10^3 / \mu\text{L}$ , o grupo 15µg/kg é mais plaquetopênico ( $p = 0,01$ ) que o grupo 10µg/kg.



**Figura 6: Total de leucaféreses realizadas no grupo 10µ/kg e 15µg**



**Figura 7: Quantidade de células CD34+ coletadas no grupo 10µ/kg e 15µ/kg**

Ao agruparmos os casos de CD34+ no sangue periférico ( $\geq 10$  ou  $< 10$  µL) pré-leucaférese com número de células de CD34+ coletadas ( $\geq 3,0$  ou  $< 3,0 \times 10^6$ /kg) observou-se uma distribuição estatisticamente significativa (tabela 10).

**Tabela 10: Células CD34+ coletadas versus CD34+ préleucaférese**

CD34+c	CD34+ <10	CD34+ $\geq 10$	X <sup>2</sup>
$< 3,0 \times 10^6$	9	22	0,04
$\geq 3,0 \times 10^6$	3	31	

CD34+c= Células CD34+ coletadas por kg de peso; CD34+<10 ou  $\geq 10$ = CD34+no sangue periférico por µL.



## 5. Discussão

Neste estudo temos duas populações distintas quanto ao diagnóstico. O grupo 10 $\mu$ g/kg foi constituída predominante por pacientes portadores de LH e LNH, enquanto o grupo 15 $\mu$ g/kg constituída por pacientes portadores de tumores sólidos, principalmente pacientes com NB. Os protocolos que os pacientes do grupo 10 $\mu$ g/kg seguiram durante o tratamento oncológico no CIB indicavam TAMO principalmente para pacientes com linfomas, com passar dos anos estudos mostraram os benefícios do TAMO para outras patologias, como por exemplo, para pacientes portadores de neuroblastoma em primeira remissão e para pacientes portadores de sarcoma de Ewing (Bradley and Cairo 2008; Ladenstein, Potechger et al. 2008; Matthay, Reynolds et al. 2009; Burkhardt, Reiter et al. 2009; Ladenstein, Potechger et al. 2010; Castro, Brunetto et al. 2011).

Também temos neste estudo duas populações distintas quanto à idade, o grupo 15 $\mu$ g/kg é mais novo quando comparado com o grupo 10 $\mu$ g/kg. O fato do grupo 15 $\mu$ g/kg ser constituído principalmente por pacientes portadores de neuroblastoma explica essa diferença, o neuroblastoma é muito comum na primeira infância (Odone, Eustáquio et al. 1983).

O número de quimioterapia recebida pré-mobilização, tem sido analisado em alguns estudos como fator negativo, quanto mais quimioterapia recebida pelos pacientes pré-mobilização, coleta se menos células CD34+. Isto não foi observado neste estudo, o número de ciclos de quimioterapia pré-mobilização não influenciou o número de leucaférese realizada e quantidade de células CD34+ coletadas (Dreger, Kloss et al. 1995; Ravagnani, Coluccia et al. 2006; Bini-Antunes, Carvalhais et al. 2006).

Pelo fato do grupo 10 $\mu$ g/kg ser formado por um terço de pacientes portadores de linfomas, explica porque este grupo irradiou mais pré-mobilização. O tratamento oncológico prevê radioterapia

nos campos envolvidos pelo linfoma. A literatura sugere que a radioterapia prévia a mobilização traria dificuldades para coletar se numero adequado de células CD34+ coletadas (Demirer, Buckner et al. 1996; Goldschmidt, Haas et al. 1997). Apesar do grupo 10µg/kg ter recebido mais radioterapia, isto não aumentou o numero de leucaférese realizadas e não afetou quantidade de células CD34+ coletadas. Devido ao numero reduzido de pacientes irradiados no 15µg/kg não foi possível realizar a comparação entre os grupos.

A idade dos pacientes tem sido avaliada por alguns autores como uma possível influência positiva na coleta de células CD34+, pacientes com menos idade coleta se mais células CD34+ (Kanold, Berger et al. 1998; Witt, Fischmeister et al. 2001; Nervi, Link et al. 2006). A maioria das crianças com menos de 5 anos de idade do grupo 15µg/kg colheram o numero mínimo de células CD34+ com uma leucaférese, corroborando com a literatura. Mas por outro lado, esta facilidade de mobilização poderia estar ligada ao fato, como sugere alguns estudos, que pacientes portadores de tumores sólidos têm capacidade de mobilização maior que os pacientes portadores de linfomas (D'Arena, Musto et al. 1998; Weaver, Tauer et al. 1998; Gazitt, Freytes et al. 1999; Sautois, Fraipont et al. 1999). Compatível com a literatura, no grupo 10µg/kg os pacientes portadores de linfomas realizaram na sua grande maioria duas a três leucaférese para alcançar o numero mínimo de células CD34+.

Apesar de Rowlings (Rowlings, To et al. 1992) demonstrar que a ciclofosfamida em altas doses aumentava o número de células CD34+ periféricas circulantes e Marques (Marques, 2000) mostrar no seu estudo, que a ciclofosfamida foi um potente mobilizador, no nosso estudo não encontramos diferenças quanto ao número de células CD34+ coletada quando comparado com doses convencionais de ciclofosfamida ou mesmo com os esquemas de mobilização sem ciclofosfamida. Sabe se que cada paciente pode responder de uma maneira à mobilização e que mais parâmetros podem afetar

negativamente, como idade na ocasião da mobilização, o tempo entre o diagnóstico e a coleta, plaquetopenia na época da mobilização e muitos outros fatores citados na literatura (Dreger, Kloss et al. 1995; Delamain 2004; Nervi, Link et al. 2006; Ravagnani, Coluccia et al. 2006).

Com este estudo, não conseguimos definir, qual o regime mais efetivo e a intensidade adequada dos quimioterápicos de mobilização, fato compatível também com a literatura (Velasquez, Cabanillas et al. 1988; Ketterer, Salles et al. 1998; Marques, 2000; Castro, Brunetto et al. 2011).

Os esquemas de quimioterapia de mobilização, tanto o grupo A e quanto o grupo B, foram muito bem tolerados pelos pacientes, mesmo os pacientes que receberam o esquema quimioterápico de mobilização com ciclofosfamida altas doses ( $4-7\text{g/m}^2$ ) (Kroger, Zeller et al. 1999).

Nenhum paciente teve aplicações de G-CSF suspensas ou reduzidas, também não apresentaram nenhum sinal flogístico nos locais de aplicação. Sete pacientes, cerca de 10%, apresentaram dor óssea leve com o uso de G-CSF, este é o efeito colateral mais comum descrito na literatura (Anderlini, Przepiorka et al. 1996; Akizuki, Mizorogi et al. 2000; Watanabe, Watanabe et al. 2006).

O *priming* com concentrado de hemácias filtradas e irradiadas, em crianças abaixo de 20 kg, permitiu que a leucaférese de grande volume fosse realizada com segurança e sem complicações. Dois pacientes apresentaram parestesia leve, secundária ao uso do anticoagulante do separador celular, durante realização de leucaférese, que foi rápida e plenamente revertida com o gluconato de cálcio 10% endovenoso (Kanold, Halle et al. 1999; Witt, Fischmeister et al. 2001; Cecyn, Seber et al. 2005).

Os problemas relacionados ao cateter de duas vias não totalmente implantado, foram poucos, somente cerca de 6% dos pacientes tiveram mau funcionamento do cateter, índice abaixo do encontrado na literatura (Dreger, Kloss et al. 1995; Marques, 2000; Bini-Antunes, Carvalhais et al. 2006; Fontana, Groebli et al. 2006). O que muito contribui para esse dado, é que no Centro Infantil

Boldrini há um grupo de cateter, formado por enfermeiros especializados em manipulação de cateteres. Enfermeiros que não fazem parte do grupo de cateter não podem manusear os cateteres.

Com exceção de uma leucaférese (1/146), que foi interrompida na metade, os separadores celulares funcionaram adequadamente, não havendo necessidade de qualquer ajuste técnico nas demais leucaféreses realizadas. O tempo da leucaférese foi bem tolerado, inclusive com as crianças menores de 5 anos. Também não houve queixas dos pacientes que tiveram o tempo de processamento aumentado por mau funcionamento do cateter e esses pacientes não apresentaram sinal e/ou sintoma de hipocalcemia secundária ao anticoagulante (Cecyn, Seber et al. 2005; Fontana, Groebli et al. 2006; Ravagnani, Coluccia et al. 2006; Ginani, Seber et al. 2011).

Apesar da plaquetopenia encontrada nos grupos, principalmente no grupo 15µg/kg, nenhum tipo de sangramento ocorreu durante e após as leucaféreses realizadas. Apenas um paciente do grupo 15µg/kg, foi transfundido com concentrado de plaquetas filtradas e irradiadas após leucaféreses. Alguns estudos demonstraram que pacientes em uso de G-CSF são mais plaquetopênicos (Faber E, R. Pytlík et al. 2006; Spiel, Bartko et al. 2011).

O número de leucócitos absolutos  $\geq 1 \times 10^3/\mu\text{L}$  e CD34+ no sangue periférico  $\geq 10\mu\text{L}$ , usados concomitantemente, mostraram ser bons parâmetros para iniciar a primeira leucaférese, principalmente o CD34+ no sangue periférico  $\geq 10\mu\text{L}$ . Entretanto o uso de CD34+ no sangue periférico  $\geq 10\mu\text{L}$  não deve ser exclusivo (Marques 2000; Delamain 2004; Ginani, Seber et al. 2011).

O grupo 15µg/kg (G-CSF 15µg/kg de peso do paciente e fracionada) diminuiu o número de leucaférese realizada para obter se o número mínimo estabelecido de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  de peso do paciente de células CD34+, e embora se tenha determinado o máximo de 3 leucaféreses neste grupo, a mediana foi de uma leucaférese. Apenas um paciente fez 3 leucaféreses, enquanto cerca de 65% atingiram o alvo

com apenas uma leucaférese. Por conseguinte, nos indica que a dose fracionada possui uma eficácia que precisa ser avaliada mais detalhadamente na população pediátrica.

Apesar da dose de G-CSF 15µg/kg de peso, usada no grupo 15µg/kg, ser 50% maior que a dose convencional, esta dose promoveu uma redução de no custo da mobilização, pois foi necessário menos leucaférese realizadas para coletar se o mínimo de células CD34+. Uma leucaférese custa aproximadamente R\$ 2500, o grupo 15µg/kg realizou em média uma leucaférese contra três leucaférese realizadas, em média, do grupo 10µg/kg. Para um país em desenvolvimento como o nosso, a redução de custo num procedimento de alta complexidade, custeado pelo SUS, é muito importante.

Esta dose do G-CSF 15µg/kg de peso e fracionada precisa ser avaliada em outros centros transplantadores pediátricos de medula óssea para ser consolidada como a dose a ser usada na mobilização de células CD34+ em pacientes oncológicos.



## 6. Conclusão

O número de células CD34+ coletadas para transplante autólogo em pediatria com o uso de G-CSF na dose de 15µg/kg de peso do paciente e fracionada foi 26% maior quando comparada com a dose convencional de 10µg/kg de peso do paciente em dose única.

A dose de G-CSF 15µg/kg de peso do paciente e fracionada diminuiu em 50% número de leucaférese realizada para atingir o número mínimo de  $3 \times 10^6$ /kg de peso de células CD34+ quando comparada com a dose convencional de 10µg/kg de peso do paciente em dose única.

A dose de 15µg/kg de peso do paciente e fracionada é mais eficaz quando comparada a dose convencional de 10µg/kg de peso do paciente em dose única.





## 7. Referências Bibliográficas

- Abramson, S., R. G. Miller, et al. (1977). "The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems." J Exp Med **145**(6): 1567-1579.
- Akizuki, S., F. Mizorogi, et al. (2000). "Pharmacokinetics and adverse events following 5-day repeated administration of lenograstim, a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, in healthy subjects." Bone Marrow Transplant **26**(9): 939-946.
- Anderlini, P. and R. Champlin (2002). "Use of filgrastim for stem cell mobilisation and transplantation in high-dose cancer chemotherapy." Drugs **62 Suppl 1**: 79-88.
- Anderlini, P., D. Przepiorka, et al. (1996). "Clinical toxicity and laboratory effects of granulocyte-colony-stimulating factor (filgrastim) mobilization and blood stem cell apheresis from normal donors, and analysis of charges for the procedures." Transfusion **36**(7): 590-595.
- Anderlini, P., J. D. Rizzo, et al. (2001). "Peripheral blood stem cell donation: an analysis from the International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) and European Group for Blood and Marrow Transplant (EBMT) databases." Bone Marrow Transplant **27**(7): 689-692.
- Appelbaum, F. R., G. P. Herzig, et al. (1978). "Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma." Blood **52**(1): 85-95.
- Arnaud, F., G. Riemersma, et al. (1984). "Comparison of apheresis and other methods for separation and purification of hemopoietic stem cells: initial experience with a blood buffy coat model for the use of autologous bone marrow transplantation." Int J Artif Organs **7**(3): 127-132.
- Barrett, A. J., P. Longhurst, et al. (1978). "Mobilization of CFU-C by exercise and ACTH induced stress in man." Exp Hematol **6**(7): 590-594.
- Basquiera, A. L., P. Abichain, et al. (2006). "The number of CD34(+) cells in peripheral blood as a predictor of the CD34(+) yield in patients going to autologous stem cell transplantation." J Clin Apher **21**(2): 92-95.
- Bellucci, R., M. S. De Propriis, et al. (1999). "Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34+ cells during mobilization with G-CSF." Bone Marrow Transplant **23**(1): 1-8.
- Benboubker, L., H. Watier, et al. (2001). "Association between the SDF1-3'A allele and high levels of CD34(+) progenitor cells mobilized into peripheral blood in humans." Br J Haematol **113**(1): 247-250.
- Bensinger, W. I., C. H. Weaver, et al. (1995). "Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor." Blood **85**(6): 1655-1658.

- Berenson, R. J., W. I. Bensinger, et al. (1991). "Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma." Blood **77**(8): 1717-1722.
- Bini-Antunes, M., A. Carvalhais et al. (2006) "Colheita de células progenitoras hematopoiéticas periféricas em doentes pediátricos." Arquivos de medicina **20**(1-2): 25-29.
- Boiron, J. M., G. Marit, et al. (1993). "Collection of peripheral blood stem cells in multiple myeloma following single high-dose cyclophosphamide with and without recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF)." Bone Marrow Transplant **12**(1): 49-55.
- Bonsignore, M. R., G. Morici, et al. (2002). "Circulating hematopoietic progenitor cells in runners." J Appl Physiol **93**(5): 1691-1697.
- Bradley, M. B. and M. S. Cairo (2008). "Stem cell transplantation for pediatric lymphoma: past, present and future." Bone Marrow Transplant **41**(2): 149-158.
- Brugieres, L., P. Quartier, et al. (2000). "Relapses of childhood anaplastic large-cell lymphoma: treatment results in a series of 41 children--a report from the French Society of Pediatric Oncology." Ann Oncol **11**(1): 53-58.
- Burkhardt, B., A. Reiter, et al. (2009). "Poor outcome for children and adolescents with progressive disease or relapse of lymphoblastic lymphoma: a report from the berlin-frankfurt-muenster group." J Clin Oncol **27**(20): 3363-3369.
- Burtness, B. A., A. Psyrrri, et al. (1999). "A phase I study of paclitaxel for mobilization of peripheral blood progenitor cells." Bone Marrow Transplant **23**(4): 311-315.
- Cagnoni, P. J. and E. J. Shpall (1996). "Mobilization and selection of CD34-positive hematopoietic progenitors." Blood Rev **10**(1): 1-7.
- Caracciolo, D., P. Gavarotti, et al. (1993). "High-dose sequential (HDS) chemotherapy with blood and marrow cell autograft as salvage treatment in very poor prognosis, relapsed non-Hodgkin's lymphoma." Bone Marrow Transplant **12**(6): 621-625.
- Castro, C., A. Seber et al. (2005). "Autologous Stem Cell Transplantation for the Treatment of Pediatric Solid Tumors in Brazil." J Pediatr Hematol Oncol **27**(9): 467. Abstracts.
- Castro, H., A. Seber et al. (2005). "Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) for the Treatment of Pediatric Hematological diseases in Brazil." J Pediatr Hematol Oncol **27**(9): 467. Abstracts.
- Castro, H., A. Brunetto et al. (2011). "Transplante autogêncio de células tronco hematopoiéticas em linfomas de Hodgkin na infância e adolescência. Experiência do serviço de oncologia do hospital de Clínicas de Porto Alegre". ABHH **33**(Supl.1): 109.
- Cecyn, K. Z., A. Seber, et al. (2005). "Large-volume leukapheresis for peripheral blood progenitor cell collection in low body weight pediatric patients: a single center experience." Transfus Apher Sci **32**(3): 269-274.

- Cline, M. J. and D. W. Golde (1977). "Mobilization of hematopoietic stem cells (CFU-C) into the peripheral blood of man by endotoxin." Exp Hematol **5**(3): 186-190.
- Cottler-Fox, M. H., T. Lapidot, et al. (2003). "Stem cell mobilization." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 419-437.
- D'Arena, G., P. Musto, et al. (1997). "When to perform peripheral blood progenitor cell collection in hematological patients?" Haematologica **82**(1): 124-125.
- D'Arena, G., P. Musto, et al. (1998). "Predictive parameters for mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cell collection in patients with hematological malignancies." Am J Hematol **58**(4): 255-262.
- D'Arena, G., P. Scalzulli, et al. (1996). "Circulating hematopoietic progenitor cells in leukapheresis: flow cytometric estimation." Haematologica **81**(1): 95-96.
- Delamain, M. (2004). "Correlação entre a quantidade de células CD34+ circulantes e a coleta por aférese de CPP em pacientes onco-hematológicos." Universidade Estadual de Campinas. Campinas São Paulo Brasil Tese de mestrado.
- Demirer, T., C. D. Buckner, et al. (1996). "Optimization of peripheral blood stem cell mobilization." Stem Cells **14**(1): 106-116.
- Dreger, P., M. Kloss, et al. (1995). "Autologous progenitor cell transplantation: prior exposure to stem cell-toxic drugs determines yield and engraftment of peripheral blood progenitor cell but not of bone marrow grafts." Blood **86**(10): 3970-3978.
- Dreger, P., P. Marquardt, et al. (1993). "Effective mobilisation of peripheral blood progenitor cells with 'Dexa-BEAM' and G-CSF: timing of harvesting and composition of the leukapheresis product." Br J Cancer **68**(5): 950-957.
- Engelhardt, M., H. Bertz, et al. (1999). "High-versus standard-dose filgrastim (rhG-CSF) for mobilization of peripheral-blood progenitor cells from allogeneic donors and CD34(+) immunoselection." J Clin Oncol **17**(7): 2160-2172.
- Faber E, R. Pytlík et al. (2006). "Individually determined dosing of filgrastim after autologous peripheral stem cell transplantation in patients with malignant lymphoma – results of a prospective multicentre controlled trial" Eur J Haematol **77**: 493–500.
- Fibbe, W. E., J. F. Pruijt, et al. (2000). "The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization." Semin Hematol **37**(1 Suppl 2): 19-24.
- Fontana, S., R. Groebli, et al. (2006). "Progenitor cell recruitment during individualized high-flow, very-large-volume apheresis for autologous transplantation improves collection efficiency." Transfusion **46**(8): 1408-1416.

- Ford, C. D., N. Pace, et al. (1998). "Factors affecting the efficiency of collection of CD34-positive peripheral blood cells by a blood cell separator." Transfusion **38**(11-12): 1046-1050.
- Fu, S. and J. Liesveld (2000). "Mobilization of hematopoietic stem cells." Blood Rev **14**(4): 205-218.
- Gandhi, M. K., K. Jestice, et al. (1999). "The minimum CD34 threshold depends on prior chemotherapy in autologous peripheral blood stem cell recipients." Bone Marrow Transplant **23**(1): 9-13.
- Gasova, Z., I. Marinov, et al. (2005). "PBPC collection techniques: standard versus large volume leukapheresis (LVL) in donors and in patients." Transfus Apher Sci **32**(2): 167-176.
- Gazitt, Y., C. O. Freytes, et al. (1999). "Successful PBSC mobilization with high-dose G-CSF for patients failing a first round of mobilization." J Hematother **8**(2): 173-183.
- Gazitt, Y. and Q. Liu (2001). "Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34+ cells in mobilized peripheral blood of non-Hodgkin's lymphoma patients." Stem Cells **19**(1): 37-45.
- Gazitt, Y., P. Shaughnessy, et al. (2001). "Expression of adhesion molecules on CD34(+) cells in peripheral blood of non-hodgkin's lymphoma patients mobilized with different growth factors." Stem Cells **19**(2): 134-143.
- Gianni, A. M., M. Bregni, et al. (1992). "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**(12): 1955-1962.
- Gianni, A. M., S. Siena, et al. (1989). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation." Lan J Haecet **2**(8663): 580-585.
- Ginani, V., A. Seber et al. (2011). "Leucoafeéres de grande volume para coleta de células-tronco hematopoéticas periféricas autólogas em crianças com câncer e menos de 30 kg." J Pediatr Hematol Oncol **33** Supl 1: 107. Abstracts.
- Goldschmidt, H., R. Haas et al. (1997). 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.
- Groto, H. W. and J. Noronha (2003). "Identificação de células tronco hematopoiéticas: Citometria de fluxo convencional versus contador hemtológico automático." Rev bras hematol hemoter **25**(3): 169-172.
- Haas, R., R. Mohle, et al. (1994). "Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma." Blood **83**(12): 3787-3794.

- Henon, P. R., H. Liang, et al. (1992). "Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants." Bone Marrow Transplant **9**(4): 285-291.
- Hiura, M., J. Murakami, et al. (1995). "[Study on peripheral blood stem cells mobilized by different chemotherapies with granulocyte-colony stimulating factor in ovarian cancer]." Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi **47**(3): 257-263.
- Janowska-Wieczorek, A., L. A. Marquez, et al. (1999). "Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane." Blood **93**(10): 3379-3390.
- Jin, F., Q. Zhai, et al. (2008). "Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization." Bone Marrow Transplant **42**(9): 581-588.
- Juergens, C., C. Weston, et al. (2006). "Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial." Pediatr Blood Cancer **47**(1): 22-29.
- Juttner, C. A., L. B. To, et al. (1989). "Autologous blood stem cell transplantation." Transplant Proc **21**(1 Pt 3): 2929-2931.
- Juttner, C. A., L. B. To, et al. (1988). "Early lympho-hemopoietic recovery after autografting using peripheral blood stem cells in acute non-lymphoblastic leukemia." Transplant Proc **20**(1): 40-42.
- Kanold, J., M. Berger, et al. (1998). "Kinetics of hematopoietic progenitor cell release induced by G-CSF-alone in children with solid tumors and leukemias." Bone Marrow Transplant **21**(1): 59-63.
- Kanold, J., P. Halle, et al. (1999). "Large-volume leukapheresis procedure for peripheral blood progenitor cell collection in children weighing 15 kg or less: efficacy and safety evaluation." Med Pediatr Oncol **32**(1): 7-10.
- Kawano, Y., T. Watanabe, et al. (1999). "Mobilization/harvest and transplantation with blood stem cells, manipulated or unmanipulated." Pediatr Transplant **3 Suppl 1**: 65-71.
- Keeney, M., I. Chin-Yee, et al. (1998). "Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering." Cytometry **34**(2): 61-70.
- Kessinger, A., J. O. Armitage, et al. (1988). "Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy." Blood **71**(3): 723-727.
- Kessinger, A., J. O. Armitage, et al. (1986). "Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells." Exp Hematol **14**(3): 192-196.

- Ketterer, N., G. Salles, et al. (1998). "Factors associated with successful mobilization of peripheral blood progenitor cells in 200 patients with lymphoid malignancies." Br J Haematol **103**(1): 235-242.
- Kobbe, G., D. Sohngen, et al. (1999). "Factors influencing G-CSF-mediated mobilization of hematopoietic progenitor cells during steady-state hematopoiesis in patients with malignant lymphoma and multiple myeloma." Ann Hematol **78**(10): 456-462.
- Kondagunta, G. V. and R. J. Motzer (2006). "Chemotherapy for advanced germ cell tumors." J Clin Oncol **24**(35): 5493-5502.
- Korbling, M. (1991). "[The role of stem cell mobilization in the scope of autologous blood stem cell transplantation]." Beitr Infusionsther **28**: 233-241.
- Korbling, M., T. M. Fliedner, et al. (1980). "Collection of large quantities of granulocyte/macrophage progenitor cells (CFUc) in man by means of continuous-flow leukapheresis." Scand J Haematol **24**(1): 22-28.
- Korbling, M., Y. O. Huh, et al. (1995). "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**(7): 2842-2848.
- Kotasek, D., K. M. Shepherd, et al. (1992). "Factors affecting blood stem cell collections following high-dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors." Bone Marrow Transplant **9**(1): 11-17.
- Kroger, N., W. Zeller, et al. (1999). "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**(2): 125-129.
- Krzyzanski, W., P. Wiczling, et al. (2010). "Population modeling of filgrastim PK-PD in healthy adults following intravenous and subcutaneous administrations." J Clin Pharmacol **50**(9 Suppl): 101S-112S.
- Ladenstein, R., R. Pearce, et al. (1997). "High-dose chemotherapy with autologous bone marrow rescue in children with poor-risk Burkitt's lymphoma: a report from the European Lymphoma Bone Marrow Transplantation Registry." Blood **90**(8): 2921-2930.
- Ladenstein, R., U. Potschger, et al. (2008). "28 years of high-dose therapy and SCT for neuroblastoma in Europe: lessons from more than 4000 procedures." Bone Marrow Transplant **41** Suppl 2: S118-127.
- Ladenstein R., U. Pötschger, et al. (2010). "Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial." J Clin Oncol **10**(20): 3284-91.

- Lane, T. A., P. Law, et al. (1995). "Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation." Blood **85**(1): 275-282.
- Lapidot, T. and I. Petit (2002). "Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells." Exp Hematol **30**(9): 973-981.
- Lataillade, J. J., D. Clay, et al. (2000). "Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival." Blood **95**(3): 756-768.
- Lefrere, F., M. Bernard, et al. (1999). "Comparison of lenograstim vs filgrastim administration following chemotherapy for peripheral blood stem cell (PBSC) collection: a retrospective study of 126 patients." Leuk Lymphoma **35**(5-6): 501-505.
- Lefrere, F., J. Makke, et al. (1999). "Blood stem cell collection using chemotherapy with or without systematic G-CSF: experience in 52 patients with multiple myeloma." Bone Marrow Transplant **24**(5): 463-466.
- Leibundgut, K., A. von Rohr, et al. (1995). "The number of circulating CD34+ blood cells predicts the colony-forming capacity of leukapheresis products in children." Bone Marrow Transplant **15**(1): 25-31.
- Liu, F., J. Poursine-Laurent, et al. (1997). "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**(7): 2522-2528.
- Lund-Johansen, F. and L. W. Terstappen (1993). "Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation." J Leukoc Biol **54**(1): 47-55.
- Majolino, I., R. Marceno, et al. (1995). "Mobilization of circulating progenitor cells in multiple myeloma during VCAD therapy with or without rhG-CSF." Haematologica **80**(2): 108-114.
- Marit, G., F. Thiessard, et al. (1998). "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**(9): 1447-1456.
- Martin-Antonio, B., M. Carmona, et al. (2011). "Impact of constitutional polymorphisms in VCAM1 and CD44 on CD34+ cell collection yield after administration of granulocyte colony-stimulating factor to healthy donors." Haematologica **96**(1): 102-109.

- Marques, J. (2000). "Mobilização e coleta das células progenitoras periféricas hemopoiéticas periféricas para transplante autólogo em pacientes onco-hematológicos." Universidade Estadual de Campinas. Campinas São Paulo Brasil Tese de doutorado.
- Matthay, K. K., C. P. Reynolds, et al. (2009). "Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study." J Clin Oncol **27**(7): 1007-1013.
- Metcalf, D. (1990). "The colony stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications." Cancer **65**(10): 2185-2195.
- Moskowitz, C. H., J. R. Glassman, et al. (1998). "Factors affecting mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with lymphoma." Clin Cancer Res **4**(2): 311-316.
- Nervi, B., D. C. Link, et al. (2006). "Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization." J Cell Biochem **99**(3): 690-705.
- Odone V., M. Eustáquio et al. (1983). "Dois tumores sólidos frequentes na infância: Neuroblastoma e tumor de Wilms" - Revisão e Atualização **5**:155-161.
- Pasquini, M. C., Z. Wang, et al. (2010). "2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders." Clin Transpl: 87-105.
- Passos-Coelho, J. L., H. G. Braine, et al. (1995). "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**(3): 705-714.
- Perea, G., A. Sureda, et al. (2001). "Predictive factors for a successful mobilization of peripheral blood CD34+ cells in multiple myeloma." Ann Hematol **80**(10): 592-597.
- Perey, L., R. Peters, et al. (1998). "Extensive phenotypic analysis of CD34 subsets in successive collections of mobilized peripheral blood progenitors." Br J Haematol **103**(3): 618-629.
- Petropoulos, D. and K. W. Chan (2005). "Umbilical cord blood transplantation." Curr Oncol Rep **7**(6): 406-409.
- Ravagnani, F., P. Coluccia, et al. (2006). "Peripheral blood stem cell collection in pediatric patients: feasibility of leukapheresis under anesthesia in uncompliant small children with solid tumors." J Clin Apher **21**(2): 85-91.
- Ravagnani, F., S. Siena, et al. (1990). "Large-scale collection of circulating haematopoietic progenitors in cancer patients treated with high-dose cyclophosphamide and recombinant human GM-CSF." Eur J Cancer **26**(5): 562-564.
- Reiffers, J., P. Bernard, et al. (1986). "Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia." Exp Hematol **14**(4): 312-315.



- Reisner, Y. and H. Segall. (1995). "Hematopoietic stem cell transplantation for cancer therapy." Curr Opin Immunol **7**(5): 687-693.
- Rowlings, P., J. Bayly, et al. (1992). "A comparison of peripheral blood stem cell mobilisation after chemotherapy with cyclophosphamide as a single agent in doses of 4g/m<sup>2</sup> or 7g/m<sup>2</sup> in patients with advanced cancer." Aust N Z J Med **22**: 660-664.
- Santini, G., C. De Souza, et al. (1999). "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**(3-4): 321-330.
- Sautois, B., V. Fraipont, et al. (1999). "Peripheral blood progenitor cell collections in cancer patients: analysis of factors affecting the yields." Haematologica **84**(4): 342-349.
- Schmitz, N., A. Bacigalupo, et al. (1996). "Transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells--the EBMT experience." Bone Marrow Transplant **17 Suppl 2**: S40-46.
- Schmitz, N., D. C. Linch, et al. (1996). "Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients." Lancet **347**(8998): 353-357.
- Schwella, N., W. Siegert, et al. (1995). "Autografting with blood progenitor cells: predictive value of preapheresis blood cell counts on progenitor cell harvest and correlation of the reinfused cell dose with hematopoietic reconstitution." Ann Hematol **71**(5): 227-234.
- Siena, S., M. Bregni, et al. (1989). "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**(6): 1905-1914.
- Spiel, A., J. Bartko, et al. (2011). "Increased platelet aggregation and in vivo platelet activation after granulocyte colony-stimulating factor administration." "A randomized controlled trial." Thromb Haemost **105**(4): 655-662.
- Socinski, M. A., S. A. Cannistra, et al. (1988). "Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man." Lancet **1**(8596): 1194-1198.
- Sureda, A., J. Petit, et al. (1999). "Mini-ICE regimen as mobilization therapy for chronic myelogenous leukaemia patients at diagnosis." Bone Marrow Transplant **24**(12): 1285-1290.
- Sutherland, D. R., A. Keating, et al. (1994). "Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry." Exp Hematol **22**(10): 1003-1010.
- Takaue, Y., Y. Kawano, et al. (1995). "Collection and transplantation of peripheral blood stem cells in very small children weighting 20 kg or less." Blood **86**(1): 372-380.

- Tarella, C., P. Corradini, et al. (1999). "Negative immunomagnetic ex vivo purging combined with high-dose chemotherapy with peripheral blood progenitor cell autograft in follicular lymphoma patients: evidence for long-term clinical and molecular remissions." Leukemia **13**(9): 1456-1462.
- To, L. B., D. N. Haylock, et al. (1997). "The biology and clinical uses of blood stem cells." Blood **89**(7): 2233-2258.
- To, L. B., M. M. Roberts, et al. (1992). "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**(4): 277-284.
- To, L. B., K. M. Shepperd, et al. (1990). "Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood." Exp Hematol **18**(5): 442-447.
- Tricot, G., S. Jagannath, et al. (1995). "Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients." Blood **85**(2): 588-596.
- Udomsakdi, C., P. M. Lansdorp, et al. (1992). "Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood." Blood **80**(10): 2513-2521.
- Van Craenenbroeck, E. M., C. J. Vrints, et al. (2008). "A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile." J Appl Physiol **104**(4): 1006-1013.
- Velasquez, W. S., F. Cabanillas, et al. (1988). "Effective salvage therapy for lymphoma with cisplatin in combination with high-dose Ara-C and dexamethasone (DHAP)." Blood **71**(1): 117-122.
- Waller CF, H. Bertz, et al. (1996). "Mobilization of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: Efficacy and toxicity of high-dose rhG-CSF regimen" Bone Marrow transplant **18**: 279-283.
- Wardyn, G. G., S. I. Rennard, et al. (2008). "Effects of exercise on hematological parameters, circulating side population cells, and cytokines." Exp Hematol **36**(2): 216-223.
- Watanabe, H., T. Watanabe, et al. (2006). "Peripheral blood stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor alone and engraftment kinetics following autologous transplantation in children and adolescents with solid tumor." Bone Marrow Transplant **37**(7): 661-668.
- Watanabe, T., Y. Kawano, et al. (1999). "Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization." Blood **93**(4): 1157-1163.
- Watts, M. J., A. M. Sullivan, et al. (1997). "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**(2): 535-546.

Weaver, C. H., K. Tauer, et al. (1998). "Second attempts at mobilization of peripheral blood stem cells in patients with initial low CD34+ cell yields." J Hematother **7**(3): 241-249.

Weaver, C. H., R. Birch, et al. (1998). "Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: Randomized evaluation of different doses of filgrastim." Br J Hematol **100**: 338-347.

Whetton, A. D. and G. J. Graham (1999). "Homing and mobilization in the stem cell niche." Trends Cell Biol **9**(6): 233-238.

Williams, S. F., J. D. Bitran, et al. (1990). "Peripheral blood-derived stem cell collections for use in autologous transplantation after high dose chemotherapy: an alternative approach." Bone Marrow Transplant **5**(2): 129-133.

Witt, V., G. Fischmeister, et al. (2001). "Collection efficiencies of MNC subpopulations during autologous CD34+ peripheral blood progenitor cell (PBPC) harvests in small children and adolescents." J Clin Apher **16**(4): 161-168.

Woods, D. (1982). "Developmental haemopoiesis." In: Hardisty, R. M. & Weathraall, D. J. London Blackwell. Blood and its disorders: 75-98.



### 8.1. Termo consentimento livre e esclarecido



#### **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA TMO AUTÓLOGO**

RECEPTOR(A) MAIOR DE IDADE

Eu, \_\_\_\_\_ autorizo à equipe médica do *CENTRO INFANTIL BOLDRINI*, sob a coordenação da Dra. Katia Aparecida de Brito Eid, realizar em minha pessoa um *TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO PERIFÉRICAS E/OU MEDULA ÓSSEA*, estando plenamente informado das minhas condições clínicas atuais, da necessidade do uso de fatores de crescimento para a coleta das células-tronco periféricas, dos riscos que tal procedimento naturalmente encerra (alguns, eventualmente fatais) e de que não existem, no momento, outras opções terapêuticas superiores ao transplante de medula óssea em relação às chances de cura e duração da sobrevida livre de doença, para minha moléstia: \_\_\_\_\_

Foram discutidos comigo os detalhes do procedimento, as drogas que serão utilizadas, os efeitos colaterais esperados e a possibilidade da ocorrência de efeitos indesejáveis inesperados. Foram salientados: 1) a ocorrência certa de um quadro transitório de *APLASIA MEDULAR* durante o qual o número dos leucócitos e das plaquetas se reduzirá a níveis críticos, causando necessidade de transfusões de sangue e risco de infecções e hemorragias potencialmente graves, que só cessará quando a medula óssea transplantada começar a funcionar, cerca de 3 a 4 semanas após o transplante; 2) a ocorrência de *EFEITOS TÓXICOS*, na sua grande maioria transitórios, mas eventualmente graves e/ou fatais a curto ou longo prazo, provocados pelos medicamentos administrados, principalmente sobre fígado, pulmões, pele, rins e vias urinárias, tubo digestivo e sistema nervoso, que foi abordada com detalhes, assim como as medidas adequadas ao seu tratamento; 3) a possibilidade de *FALHA* ou *INSUFICIÊNCIA DE PEGA DO ENXERTO*. Discutiu-se a possibilidade da ocorrência de efeitos colaterais a longo prazo, provocados pelo procedimento e medicamentos administrados, e dentre eles foram enfatizados a *ESTERILIDADE* e o aumento da chance de se adquirir *OUTRAS DOENÇAS MALIGNAS*, mesmo que vários anos após o transplante.

Também se discutiu o prognóstico de minha doença e as opções terapêuticas alternativas ao transplante, estando eu consciente de que, embora o transplante seja a alternativa que ofereça mais chances de cura, a ocorrência de uma recidiva de minha doença é possível, e *NÃO EXISTEM GARANTIAS DE CURA*. Todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas, e minhas dúvidas esclarecidas; a opção do transplante é de minha inteira responsabilidade, foi tomada de modo consciente, voluntário e com a participação dos meus familiares mais próximos, além disso autorizo o uso dos dados do meu prontuário em trabalhos, teses, artigos e Registros Nacionais e/ou Internacionais.

OBS Complementares: \_\_\_\_\_

Campinas, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Telefone pesquisador: 37875087/37875000

Telefone CEP-Boldrini: 37875001

Nº 01926012.0.0000.5376

**TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA TMO AUTÓLOGO**

**RECEPTOR (A) MENOR DE IDADE**

Eu, \_\_\_\_\_, autorizo à equipe médica do CENTRO INFANTIL BOLDRINI, sob a coordenação da Dra. Katia Aparecida de Brito Eid, realizar no(a) menor: \_\_\_\_\_ um

*TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO PERIFÉRICAS E/OU MEDULA ÓSSEA*, estando plenamente informado das condições clínicas atuais do(a) receptor(a), da necessidade do uso de fatores de crescimento para a coleta das células-tronco periféricas, dos riscos que tal procedimento naturalmente encerra (alguns, eventualmente fatais) e de que não existem, no momento, outras opções terapêuticas superiores ao transplante de medula óssea em relação às chances de cura e duração da sobrevida livre de doença, para a moléstia do(a) receptor(a): \_\_\_\_\_.

Foram discutidos comigo os detalhes do procedimento, as drogas que serão utilizadas, os efeitos colaterais esperados e a possibilidade da ocorrência de efeitos indesejáveis inesperados. Foram salientados: 1) a ocorrência certa de um quadro transitório de *APLASIA MEDULAR* durante o qual o número dos leucócitos e das plaquetas se reduzirá a níveis críticos, causando necessidade de transfusões de sangue e risco de infecções e hemorragias potencialmente graves, que só cessará quando a medula óssea transplantada começar a funcionar, cerca de 3 a 4 semanas após o transplante; 2) a ocorrência de *EFEITOS TÓXICOS*, na sua grande maioria transitórios, mas eventualmente graves e/ou fatais a curto ou longo prazo, provocados pelos medicamentos administrados, principalmente sobre fígado, pulmões, pele, rins e vias urinárias, tubo digestivo e sistema nervoso, que foi abordada com detalhes, assim como as medidas adequadas ao seu tratamento; 3) a possibilidade de *FALHA* ou *INSUFICIÊNCIA DE PEGA DO ENXERTO*. Discutiu-se a possibilidade da ocorrência de efeitos colaterais a longo prazo, provocados pelo procedimento e medicamentos administrados, e dentre eles foram enfatizados a *ESTERILIDADE* e o aumento da chance de se adquirir *OUTRAS DOENÇAS MALIGNAS*, mesmo que vários anos após o transplante.

Também se discutiu o prognóstico da doença do(a) receptor(a) e as opções terapêuticas alternativas ao transplante, estando eu consciente de que, embora o transplante seja a alternativa que ofereça mais chances de cura, a ocorrência de uma recidiva da doença é possível, e *NÃO EXISTEM GARANTIAS DE CURA*. Todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas, e minhas dúvidas esclarecidas; a opção do transplante é de minha inteira responsabilidade, foi tomada de modo consciente, voluntário e com a participação dos meus familiares mais próximos, além disso autorizo o uso dos dados do prontuário, planilhas e questionários preenchidos em trabalhos, teses, artigos e Registros Nacionais e/ou Internacionais.

OBS Complementares: \_\_\_\_\_

Campinas, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Telefone pesquisador: 37875087/37875000  
Telefone CEP-Boldrini: 37875001  
Nº CAAE 01926012.0.0000.5376

**Pesquisador:** Katia Aparecida de Brito Eid

**Título:** Mobilização e coleta de CD34+ para transplante autólogo de células progenitoras periféricas hematopoiéticas em pediatria. Análise de duas doses diferentes do GCSF.

**Instituição:** Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A Boldrini

**Versão:** 2

**CAAE:** 01926012.0.0000.5376

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**Número do Parecer:** 58239

**Data da Relatoria:** 22/06/2012

**PROJETO DE PESQUISA**

**Área Temática:** Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Alguns tumores pediátricos (neuroblastoma, tumores de células germinativas, sarcomas e linfomas) utilizam como tratamento quimioterapia em altas doses com resgate de células de progenitora periférica hematopoiética (CPPH) As CPPH são capazes de restaurar plenamente a hematopoiese após esquemas quimioterápicos mieloablativos. O regime quimioterápico, para a mobilização de CPPH, mais eficaz ainda não foi estabelecido, mas sabe-se que as CPPH são influenciadas por número de tratamentos quimioterápicos prévios a utilização da CPPH. Outras modalidades terapêuticas, como radioterapia prévia, também influenciam na coleta de CPPH.

**Apresentação do Projeto:**

Avaliar a resposta terapêutica frente ao uso do G-CSF na dose de 15 mcg/kg de peso, e fracionada (10 mcg/kg de peso às 4h e 5mcg/kg de peso às 16h). Objetivo Secundário: Identificar fatores preditivos para a eficiência da coleta de CPPH. Avaliar o número de CPPH coletadas, em uso de G-CSF, e a relação com o número de aférese e os dias para recuperação medular. Comparar os dados hematológicos pré- e pós-leucaférese.

**Objetivo da Pesquisa:**

O benefício é o maior número de CD34+ coletado, menor número de aférese realizada. Não há risco novo, apenas os já existentes nos esquemas de mobilização e transplante de medula óssea autólogo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

As CPPH são capazes de restaurar plenamente a hematopoiese após esquemas quimioterápicos mieloablativos. O uso prévio de G-CSF na mobilização aumenta o número de CD34+ coletado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE adequado.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

### 8.1.1. Termo de consentimento para coleta de CPP



#### Termo de Consentimento Informado para coleta de CPP

**HEMOCENTRO UNICAMP  
DIVISÃO DE HEMOTERAPIA  
SEÇÃO DE PROCEDIMENTOS ESPECIALIZADOS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

\_\_\_\_\_, portador (a) do RG N° \_\_\_\_\_, consinto com o procedimento de doação de componentes sanguíneos 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 anti-coagulação com solução de citrato de sódio, bem como os sintomas que o procedimento poderá ocasionar.

Campinas, \_\_ de \_\_\_\_\_ de 19\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
assinatura do paciente ou responsável

b



## **8.2. *Performace status***

### **8.2.1. *Karnofsky Performace status***

- 100% - normal, sem queixas, sem sinais de doença
- 90% - capaz de atividade normal, poucos sinais ou sintomas de doença
- 80% - atividade normal com alguma dificuldade, alguns sinais e sintomas
- 70% - capaz de cuidar de si próprio, incapaz de atividade normal ou trabalho
- 60% - necessidade de alguma ajuda, capaz de cuidar da maioria das necessidades próprias
- 50% - frequentemente necessita de ajuda, necessita de atenção médica frequente
- 40% - incapaz, necessita de cuidado especial e ajuda
- 30% - gravemente incapaz, admissão hospitalar indicada mas sem risco de morte
- 20% - muito doente, necessidade de admissão imediata e medidas de suporte ou tratamento
- 10% - moribundo, rápida progressão para doença fatal
- 0% - morte.

### **8.2.2. *Lansky Performace status***

- 100% = Fully active, normal
- 90% = Minor restrictions in physically strenuous activity
- 80% = Active, but tires more quickly
- 70% = Both greater restriction of, and less time spent in, play activities
- 60% = Up and around, but minimal active play; keeps busy with quieter activities
- 50% = Gets dressed but lies around much of the day; no active play; able to participate in all quiet play and activities
- 40% = Mostly in bed; participates in quiet activities
- 30% = In bed; needs assistance even for quiet play
- 20% = Often sleeping; play entirely limited to very passive activities
- 10% = No play; does not get out of bed 5% = Unresponsive 0% = Dead

## 8.3. Estadiamento

### 8.3.1. Classificação de Ann Arbor

---

**Estádio I: adenopatia em uma região linfonodal;**

**Estádio II: duas ou mais regiões linfonodais, mas do mesmo lado do diafragma;**

**Estádio III: acometimento de ambos os lados do diafragma;**

**Estádio IV: envolvimento de medula óssea;**

**“e” indica doença extra linfática (por exemplo, acometendo fígado);**

**“s” indica acometimento do baço.**

**“B” presença de sintomas como febre, perda ponderal >10%, sudorese.**

---

### 8.3.2. Classificação de Murfy

<b>ESTÁDIO I</b>	<b>Um único tumor (nodal ou extranodal), com exceção do mediastino e abdômen.</b>
<b>ESTÁDIO II</b>	Um ou mais tumores (nodais ou extranodais) do mesmo lado do diafragma. Tumor abdominal primário totalmente ressecado.
<b>ESTÁDIO III</b>	Dois ou mais tumores (nodais ou extranodais), acima e abaixo do diafragma. Tumor primário de mediastino. Tumor abdominal irressecável, podendo ter comprometimento dos linfonodos paraaórticos, retroperitoneais e ascite. Tumor paraespinal ou epidural independente de outras localizações. 24
<b>ESTÁDIO IV</b>	Qualquer um dos acima descritos com infiltração de SNC e/ou medula óssea.

### 8.3.3. Tabela INSS

**Tabela 1: DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO POR GRUPO DE RISCO**

Estadio INSS	Idade	Status MYCN	Histologia Shimada	Ploidia DNA*	Grupo de Risco	Registro Inicial do Estudo
1	0-21 anos	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Baixo	P9641
2A/2B <sup>1</sup>	<365 dias	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Baixo	P9641
	≥ 365 d-21 anos	Não-Amp	Qualquer	-	Baixo	P9641
	≥ 365 d-21 anos	Amp	Fav	-	Baixo	P9641
	≥ 365 d-21 anos	Amp	Desfav	-	Alto	Alto-risco
3 <sup>3</sup>	<365 dias	Não-Amp	Qualquer	Qualquer	Intermediário	A3961
	<365 dias	Amp	Qualquer	Qualquer	Alto	Alto-risco
	≥ 365 d-21 anos	Não-Amp	Fav	-	Intermediário	A3961
	≥ 365 d-21 anos	Não-Amp	Desfav	-	Alto	Alto-risco
4 <sup>3</sup>	≥ 365 d-21 anos	Amp	Qualquer	-	Alto	Alto-risco
	<365 dias	Não-Amp	Qualquer	Qualquer	Intermediário	A3961
	<365 dias	Amp	Qualquer	Qualquer	Alto	Alto-risco
4S <sup>2</sup>	≥ 365 d-21 anos	Qualquer	Qualquer	-	Alto	Alto-risco
	<365 dias	Não-Amp	Fav	>1	Baixo	P9641
	<365 dias	Não-Amp	Qualquer	=1	Intermediário	A3961
	<365 dias	Não-Amp	Desfav	Qualquer	Intermediário	A3961
	<365 dias	Amp	Qualquer	Qualquer	Alto	Alto-risco

Biologia definida por:

Status MYCN:

Amplificado (Amp) vs. Não-Amplificado (Não-amp)

Histopatologia Shimada:

Favorável (Fav) vs. Desfavorável (Desfav)

Ploidia do DNA:

Índice de DNA (DI) > 1 ou = 1; tumores hipodiplóides (com DI <1) serão tratados como um tumor com um DI > 1. (índice de DNA < 1 (hipodiploidia) a ser considerado como ploidia favorável).

#### 8.4. Técnica para coleta de CHHP em separador celular

Abaixo um exemplo de funcionamento de um separador celular automático de fluxo contínuo.

Após ligar o equipamento, acoplar o *kit* de soluções, fechando a bolsa de transferências e abrindo a de coleta. Programar o equipamento para o fluxo de retirada sanguínea de acordo com a velocidade desejada (40 a 100 ml/min.). Iniciar infusão do anticoagulante, até a concentração de 1:16. Inverter o retentor de ar até enche-lo com solução fisiológica/CHFI (*priming*). Enquanto o equipamento é preenchido com o *priming*, programar o equipamento com os valores do hematócrito do paciente seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante, após preenchimento, abrir a via de retorno. Abrir a via de retirada, preenche-la com solução fisiológica. Conectar as vias do cateter, uma na via de retirada e outra na via de retorno. Apertar a tecla iniciar. Quando o volume sanguíneo atingir o desejado, aproximadamente 4 volemias, iniciar a reinfusão, utilizando a via de retorno. Fechar a via de retirada, coletar amostras após procedimento e por fim desconectar a via retirada do cateter do equipamento. Após reinfusão, desconectar a via de retorno da via do cateter. Abrir a bolsa de transferência. Fechar a bolsa de coleta, que automaticamente encherá a bolsa de transferência com o produto da coleta (CPPH).