

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
SIBELLE MATTOS FLORES

**Criopreservação de Células-Tronco Hematopoéticas
do Sangue Periférico – Impacto sobre a Recuperação
Celular e Hematopoética no Transplante Autólogo**

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Sibelle Mattos Flores

**Criopreservação de Células-Tronco Hematopoéticas
do Sangue Periférico – Impacto sobre a Recuperação
Celular e Hematopoética no Transplante Autólogo**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de
Janeiro para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Médicas**

Orientadores: Angelo Maiolino

Hélio dos Santos Dutra

Rio de Janeiro

2009

Flores, Sibelle Mattos

Criopreservação de Células-Tronco hematopóéticas do Sangue Periférico – Impacto sobre a recuperação celular e hematológica no transplante autólogo / Sibelle Mattos Flores. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2009.

108 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Ângelo Maiolino e Hélio dos Santos Dutra

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina / Pós-graduação em Clínica Médica, 2009.

Referências bibliográficas: f. 87-103

1. Células-Tronco Hematopoéticas. 2. Criopreservação. 3. Transplante autólogo.
4. Hematologia - Tese. I. Maiolino, Ângelo II. Dutra, Hélio dos Santos. III.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Pós-graduação em

Sibelle Mattos Flores

**Criopreservação de Células-Tronco Hematopoéticas
do Sangue Periférico – Impacto sobre a Recuperação Celular
e Hematopoética no Transplante Autólogo**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da
Universidade Federal do Rio de Janeiro para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Médicas

Aprovada em 25 de agosto de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ângelo Maiolino (Orientador)

Prof. Dr. Hélio dos Santos Dutra (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Maria Izabel Doria Rossi

Dr^a. Maria Ignez Capella Gaspar Elsas

Prof Dr Rony Schafell

Rio de Janeiro
agosto, 2009

Agradecimentos

À Deus por tudo.

À **minha família**, especialmente ao meu **esposo André e ao meu filho Gustavo**, que souberam compreender os momentos da minha ausência e apoiaram o meu desafio.

À **Marinha do Brasil** por ter me concedido a oportunidade do Mestrado.

Ao Comandante Capitão-de-Mar e Guerra (S) **Santos Filho** por acreditar na minha capacidade e pela sua visão empreendedora no quadro de Saúde do Corpo de Saúde da Marinha.

À Capitão- de- Mar e Guerra (Md) **Verônica** por ter me indicado para o Mestrado.

Ao Capitão-de-Fragata (Md) **Marcos Cunha** por ter me indicado os orientadores.

Ao **Professor Doutor Ângelo** por ter me recebido inusitadamente e aceitado ser meu orientador.

Ao **Professor Doutor Hélio Dutra** por também ter aceitado ser meu orientador e apoiado o meu aprendizado.

A **toda equipe do Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho**.

À **PABCAM, Banco de Células e Laboratório de Criopreservação de Medula Óssea**, bem como aos **seus coordenadores**.

À **equipe do Laboratório de Cultura e Criopreservação de Medula Óssea**. Em especial ao **Gabriel Verânio** por ter iniciado a coleta dos primeiros dados deste trabalho e à **Débora Nery** pela a grande amizade e pela ajuda em todas as fases do estudo e discussões sobre o tema do estudo. A ajuda de vocês foi imprescindível.

À **Professora Doutora Isabel Rossi** pelos conhecimentos da disciplina de Hematopoese.

À **Doutora Márcia Garnica** pelo apoio com a análise dos resultados.

Ao **Professor Doutor Ronir Raggio** pelos conhecimentos transmitidos em Bioestatística.

Aos alunos da disciplina do PINC, **Bruno Rabinovici Gherma e Jaqueline de Moraes Pereira** pela ajuda na coleta dos dados clínicos.

Aos **meus colegas e funcionários de trabalho** que me substituíram na minha ausência no Laboratório de Hematologia do Hospital Naval Marcílio Dias.

Em especial **agradeço aos pacientes**, que através da luta contra a própria doença ajudam a evolução da ciência, contribuem para melhorar o tratamento de pessoas com doenças semelhantes.

“Há homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores.

Há os que lutam muitos anos e são muito bons.

Porém, há os que lutam toda a vida.

“Esses são os imprescindíveis.” Bertolt Brecht

RESUMO

Flores, Mattos Sibelle. Criopreservação de Células-Tronco Hematopoéticas do Sangue Periférico – Impacto sobre a Recuperação Celular e Hematopoética no Transplante Autólogo. Dissertação (Mestrado em Ciência Médicas)-Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

No Transplante Autólogo, as Células-Tronco Hematopoéticas (CTHs) são mantidas criopreservadas até o momento da reinfusão. O volume de produto congelado influencia no custo do procedimento e na quantidade de agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) infundido. A infusão de grande volume de material criopreservado aumenta a toxicidade relativa ao DMSO. A redução do volume final do produto criopreservado com conseqüente aumento da concentração celular tem sido proposta como alternativa para contornar estas limitações. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do número de células criopreservadas na recuperação dos progenitores hematopoéticos, após o congelamento, e a cinética da recuperação hematopoética nos pacientes transplantados. Desta forma, foram comparados dois protocolos utilizados na criopreservação de CTHs: protocolo A (1×10^8 cél./mL) e protocolo B (2×10^8 cél./mL). Foram analisados 419 produtos de leucaféreses, 280 criopreservados com protocolo A e 139 criopreservados com protocolo B, quanto à recuperação da viabilidade celular e dos progenitores CFU-GM (Unidade Formadora de Colônia-Granulócitos e Macrófago, do inglês Colony Forming Units-Granulocyte-Macrophage). Duzentos e setenta e cinco pacientes que tiveram os produtos de leucaféreses criopreservados com o protocolo A (Grupo A; 173 pacientes) ou protocolo B (Grupo B; 102 pacientes) foram estudados quanto à cinética da recuperação hematopoética, após o transplante autólogo com células mobilizadas para o sangue periférico. Não foi observado prejuízo na recuperação da viabilidade celular ou dos progenitores CFU-GM nos produtos

criopreservados com protocolo B, quando comparados com os produtos criopreservados com protocolo A. O tempo mediano para recuperação dos neutrófilos e recuperação das plaquetas nos Grupos A e B foram 11 e 11 dias, $p=0,01$; 12 e 12 dias, $p=0,73$, respectivamente. Somente a concentração de células $CD34^+ \times 10^6/Kg$ e $CFU-GM \times 10^4/Kg$ foram fatores influente na velocidade de recuperação hematopoiética, após análise de regressão multivariada. A criopreservação de produtos de leucaféreses de CTHs, mobilizadas para o SP, com a concentração celular de $2,0 \times 10^8$ células/mL não prejudica a recuperação celular nem a recuperação hematopoiética no transplante autólogo, quando comparada com o congelamento com concentração celular de $1,0 \times 10^8$ células/mL.

Palavras-chave: Células-Tronco Hemapoéticas, Criopreservação, Transplante autólogo

ABSTRACT

Hematopoietic Stem Cells (HSC) are cryopreserved until the time of infusion in autologous transplantation. The volume of frozen autograft product impacts the cost of the processing and the amount of agent cryoprotector dimethylsulfoxide (DMSO) infused. The infusion of large amount of cryopreserved product increases the risk of complications associated with the infusion of DMSO. As an alternative for these limitations has been proposed the decrease in volume of cryopreserved product so freezing the cells at higher cellular concentrations. The aim of this study was to evaluate the influence of cell concentrations during cryopreservation on recovery of hematopoietic progenitors and the kinetics of hematopoietic recovery of patients who underwent autologous transplantation. Two protocols employed in the cryopreservation were compared evaluated: protocol A (1×10^8 cél. /mL) and protocol B (2×10^8 cél. /mL). Four hundred and nineteen leukapheresis products cryopreserved at protocol A (280 products) or B (139 products) were analyzed for recovery of viability and recovery of CFU-GM (Colony Forming Units- Granulocyte-Macrophage). Two hundred and seventy-five patients who had leukapheresis products cryopreserved of the protocol A (group A, 173 patients) or protocol B (Group B, 102 patients) were studied on the kinetics of hematopoietic recovery after autologous transplantation with peripheral blood stem cell (PBSC). There were no significant differences in recovery of viability or recovery of CFU-GM of cryopreserved products at protocols A and B. The time in days to neutrophil recovery of $\geq 500/\mu\text{L}$ and platelet recovery of $\geq 20.000/\mu\text{L}$ in groups A and B were 11 and 11, $p=0,01$; 12 and 12, $p=0,73$ respectively. In multivariate analyses only $\text{CD}34^+ \times 10^6$ cell and $\text{CFU-GM} \times 10^4$ were influent in hematopoietic recovery. The cryopreservation of PBPC at 2×10^8 cells / mL did not affect the cell recovery neither hematopoietic recovery in autologous transplant.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Célula–Tronco Hematopoética e a interação com microambiente medular. | 23 |
| Figura 2. Hierarquia do Sistema Hematopoético. | 25 |
| Figura 3. Indicações para o Transplante com Células-Tronco Hematopoética na América do Norte, 2005. | 28 |
| Figura 4. Etapas do Processo de Criopreservação das CTHs. | 33 |
| Figura 5. Curva do Congelamento | 44 |
| Figura 6. Curva ROC- Dose de células $CD34^+ \times 10^6 / Kg$ para a Recuperação de Neutrófilos até décimo - primeiro dia. | 55 |
| Figura 7. Curva ROC- Dose de células $CFU-GM \times 10^4 / Kg$ para a Recuperação de Neutrófilos até décimo - primeiro dia. | 56 |
| Figura 8. Gráfico das curvas de probabilidade de recuperação de neutrófilos $\geq 500 / \mu L$. | 60 |
| Figura 9. Gráfico da correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6 / kg$ e de $CFU-GM \times 10^4 / kg$ infundidos. | 61 |
| Figura 10. Gráfico da correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6 / kg$ infundido e o tempo para recuperação de neutrófilos $\geq 500 / \mu L$. | 63 |
| Figura 11. Gráfico das curvas de probabilidade de recuperação de plaquetas $\geq 20.000 / \mu L$. | 65 |
| Figura 12. Gráfico da correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6 / kg$ infundido e o tempo para recuperação de plaquetas $\geq 20.000 / \mu L$. | 67 |
| Figura 13. Gráfico das curvas de probabilidade da Duração da neutropenia | 69 |
| Figura 14. Gráfico da correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6 / kg$ infundido e a duração da neutropenia. | 71 |
| Figura 15. Gráfico da Classificação do episódio de neutropenia febril. | 73 |
| Figura 16. Comparação da recuperação da viabilidade celular em produtos de leucaféreses após a criopreservação. | 77 |
| Figura 17- Comparação da recuperação dos progenitores $CFU-GM$ em produtos de leucaféreses após a criopreservação. | 78 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Estudos publicados que avaliaram o efeito da concentração celular na recuperação celular e hematopoética. | 38 |
| Tabela 2. Regimes de Condicionamento. | 42 |
| Tabela 3. Características clínicas dos pacientes. | 52 |
| Tabela 4. Características do Tratamento com Transplante. | 53 |
| Tabela 5. Características do produto final infundido no transplante. | 54 |
| Tabela 6. Definição da dose de células CD34 ⁺ e CFU-GM pela curva de ROC. | 54 |
| Tabela 7. Desfechos hematológicos. | 57 |
| Tabela 8. Desfechos clínicos. | 58 |
| Tabela 9. Regressão de Cox dos fatores influentes no Tempo para recuperação dos neutrófilos. | 62 |
| Tabela 10. Regressão de Cox dos fatores influentes no Tempo para recuperação de plaquetas. | 66 |
| Tabela 11. Regressão de Cox dos fatores influentes na Duração da Neutropenia. | 70 |
| Tabela 12. Análise de Correlação de Spearman's entre as variáveis células CD34 ⁺ x10 ⁶ /Kg e CFU-GM x10 ⁴ /Kg infundidos e as variáveis de tempo para recuperação hematológica. | 72 |
| Tabela 13. Variáveis dos produtos de leucaféreses antes da criopreservação. | 75 |
| Tabela 14. Variáveis dos produtos de leucaféreses após a criopreservação. | 76 |
| Tabela 15. Cálculo da economia do processo de criopreservação comparando os dois protocolos | 79 |

Lista de Anexos

| | |
|--|-----|
| Anexo I - Fichas para Coleta de Dados | 105 |
| Anexo II - Deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP | 108 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| BEAM | Carmustina, Etoposideo, Citarabina e Melfalan |
| BCNU | Carmustina |
| BFU-E | Explosão/Surgimento de Unidade Formadores-Eritrócitos |
| Bu/Cy | Bussulfan e Ciclofosfamida |
| CBV | Ciclofosfamida, Carmustina e Etoposideo |
| Cb/Vp | Carboplatina e Etoposideo |
| CD | Cluster Differentiation |
| CFU-GM | Unidade Formadora de Colônia- Granulócito e Macrófagos |
| CP | Células Progenitoras |
| CT | Células-Tronco |
| CTH | Células-Tronco Hematopoéticas |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EBMT | European Group for Blood and Marrow Transplantation |
| FITC | Isotiocianato de Fluoresceína |
| G-CSF | Fator estimulante de Colônia de Granulócitos |
| GM-CSF | Fator estimulante de Colônia de Granulócitos e Macrófagos |
| HES | Hidroxietilamido |
| ISHAGE | International Society for Hematotherapy and Graft Engineering |
| MEL | Melfalan |
| MO | Medula Óssea |
| PE | Ficoeritrina |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SP | Sangue Periférico |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 2.1 Células-Tronco | 18 |
| 2.1.1 Células-Tronco embrionárias | 19 |
| 2.1.2 Células-Tronco adultas | 19 |
| 2.2 Células-Tronco Hematopoéticas | 20 |
| 2.2.1 Ontogenia | 21 |
| 2.2.2 Microambiente Medular | 22 |
| 2.2.3 Hematopoese | 24 |
| 2.3 Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas | 26 |
| 2.4 Fontes de Células- Tronco Hematopoética | 29 |
| 2.4.1 Células-Tronco e Progenitoras da Medula Óssea | 29 |
| 2.4.2 Células-Tronco e Progenitoras Mobilizadas para o SP | 30 |
| 2.5 Criopreservação | 31 |
| 2.6 Crioprotetores | 34 |
| 2.7 Concentração Celular | 34 |
| 2.7.1 Estudos com Concentração Celular até 2×10^8 células/mL | 35 |
| 2.7.2 Estudos com Concentração Celular acima de 2×10^8 células/mL | 36 |
| 3 OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 Principais | 39 |
| 3.2 Secundários | 39 |
| 4 PACIENTES E MÉTODOS | 40 |
| 4.1 População de Estudo | 40 |
| 4.1.1 Critérios de Inclusão | 40 |
| 4.1.2 Critérios de Exclusão | 40 |

| | |
|---|-----|
| 4.2 Desenho do Estudo | 41 |
| 4.3 Mobilização e Coleta de Células-Tronco e Progenitoras do SP | 41 |
| 4.4 Quimioterapia de Altas Doses | 41 |
| 4.5 Criopreservação | 43 |
| 4.6 Contagem e Viabilidade celular | 44 |
| 4.7 Contagem das Células CD34 ⁺ | 45 |
| 4.8 Ensaio Clonogênico | 45 |
| 4.9 Descongelamento e Infusão | 46 |
| 4.10 Administração de G-CSF e Tratamento de Suporte | 47 |
| 4.11 Coleta dos Dados | 47 |
| 4.12 Definição dos Desfechos de Interesse | 48 |
| 4.13 Métodos Estatísticos | 49 |
| 5 RESULTADOS | 50 |
| 5.1 Características dos Pacientes e dos Transplantes | 50 |
| 5.2 Desfechos Hematológicos e Clínicos | 57 |
| 5.2.1 Tempo para recuperação de neutrófilos | 58 |
| 5.2.2 Tempo para recuperação de Plaquetas | 64 |
| 5.2.3 Duração da Neutropenia | 68 |
| 5.2.4 Febre associada à neutropenia | 72 |
| 5.2.5 Classificação do episódio febril | 72 |
| 5.2.6 Mortalidade | 74 |
| 5.3 Características dos Produtos de leucaféreses | 74 |
| 6 DISCUSSÃO | 80 |
| 7 CONCLUSÕES | 87 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |
| 9 ANEXOS | 105 |

1 Introdução

A quimioterapia em altas doses seguida de transplante autólogo de Células-Tronco Hematopoéticas (CTHs) tem sido utilizada no tratamento de pacientes com doenças onco-hematológicas como leucemia, linfoma, mieloma e tumores sólidos (HOŁOWIECKI, 2008). A intensificação das doses de quimioterapia contribui de forma decisiva para um melhor controle de diversas doenças malignas. No entanto, esta terapia é tóxica para as células em proliferação como as CTHs e seus progenitores (DEVETTEN & ARMITAGE, 2007). A mielossupressão causada pela intensificação dos quimioterápicos expõe os pacientes a complicações infecciosas por vezes fatais (ZUCCOTTI *et al.* 2005). O tempo para a recuperação hematopoética e o controle das complicações são fatores que diminuem o risco de morte ocasionada por esta terapia (VOSE & ARMITAGE, 1995). A quantidade de células viáveis e os diferentes tipos celulares transplantados são influentes na recuperação hematopoética após o transplante (BENDER *et al.* 1994).

Os primeiros transplantes autólogos utilizaram como fonte de CTHs a Medula Óssea (MO). A coleta nesta fonte é feita em Centro Cirúrgico, onde o paciente é submetido à anestesia geral e as células são colhidas por múltiplas aspirações da MO da crista ilíaca superior (PAMPHILON, 2004). A descoberta que as citocinas ou fatores de crescimento mobilizam as CTHs e Progenitoras para o sangue periférico (SP) propiciou a utilização do SP como fonte de CTHs para transplante (KROSCHINSKY *et al.* 2008). A combinação de agente quimioterápico e citocinas como o G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos, do inglês Granulocyte colony- stimulating factor) e o GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês Granulocyte-Macrophage colony- stimulating factor) potencializa a mobilização de CTHs para o SP (NERVI *et al.*, 2006). A coleta destas células nesta fonte pode ser realizada por acesso venoso duplo utilizando aparelho de leucaférese ou separador de células com fluxo contínuo (JANSEN *et*

al., 2005). Além da vantagem de uma obtenção menos traumática, por meio de aparelhos de leucaférese e acesso venoso, a quantidade de CTHs obtidas após mobilização é superior à obtida pelo punção direta da MO (ARSLAN & MOOG, 2007).

No transplante autólogo, a criopreservação e a estocagem das CTHs são necessárias para utilização após a terapia de condicionamento com quimioterapia em altas doses de. Assim, o conhecimento dos mecanismos físico-químicos que ocorrem durante o congelamento e descongelamento é de suma importância para manter-se a estrutura e a integridade funcional das células e tecidos congelados (MERYMAN, 2007).

A utilização de protocolos que utilizam crioprotetores e controle da temperatura de congelamento visa diminuir perdas celulares por mudanças de temperatura inerentes ao processo de congelamento (PEGG, 2006). Entre os fatores que afetam a eficácia da criopreservação destacam-se a velocidade do congelamento, a concentração do agente crioprotetor, o controle da temperatura durante a adição do agente crioprotetor e a concentração celular (PAMPHILON, 2004).

Os efeitos crioprotetores do Dimetilsulfóxido (DMSO) foram propostos por Lovelock e Bishop em 1959. A maior vantagem deste agente, em relação a outros crioprotetores, é a capacidade de difusão rápida para o interior das células e a baixa toxicidade celular, porém efeitos clínicos tais como: náusea, vômito, cólica, diarreia, arritmia, hipertensão são observados e proporcionais à dose de DMSO administrada durante o transplante (WINDRUM *et al.*, 2005). A proporção de DMSO mais utilizada nos protocolos de criopreservação é 10% do volume total do material a ser reinfundido (WINDRUM *et al.*, 2005). Protocolos que visam à diminuição da quantidade de DMSO reinfundida têm sido testados, e têm importante aplicabilidade em pacientes pediátricos (CURCOY *et al.*, 2002).

Os protocolos de criopreservação das CTHs obtidas da MO utilizam a concentração celular máxima de 2×10^7 céls./mL (BAKKEN, 2006). A criopreservação das células

mobilizadas do SP com estes protocolos resultaria em grande volume do produto final e proporcionalmente de DMSO a ser infundido (BAKKEN, 2006). A redução do volume final do produto criopreservado com conseqüente aumento da concentração celular tem sido proposta como alternativa para contornar estas limitações (ROWLEY *et al.*, 1994; PERSEGHIN *et al.* 1997; KAWANO *et al.*, 2004; CABEZUDO *et al.* 2000 e MARTIN-HENAO *et al.*, 2005). No entanto, poucas instituições que realizam a criopreservação de células para transplante estudaram os efeitos do aumento da concentração sobre a recuperação celular e a cinética da recuperação hematopoética em pacientes transplantados (ROWLEY *et al.*, 1994; PERSEGHIN *et al.* 1997; KAWANO *et al.*, 2004; CABEZUDO *et al.* 2000 e MARTIN-HENAO *et al.*, 2005). As diferentes metodologias empregadas nestes estudos têm como conseqüência a falta de comparabilidade entre os resultados propostos.

Apesar da falta de padronização dos protocolos de criopreservação utilizados, diversos Centros de Transplante do Mundo realizam a criopreservação com a concentração celular de 2×10^8 células/mL e 10% de DMSO (WINDRUM *et al.* 2005). Estes fatos, associados à necessidade de avaliação das mudanças ocorridas nos protocolos de criopreservação da nossa Instituição, motivaram a realização do presente estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células-Tronco

As Células-Troncos (CTs) são definidas como células indiferenciadas e não-especializadas que são capazes de multiplicarem-se mantendo as mesmas características por longos períodos, mas, diante de estímulos específicos, podem diferenciar-se em células maduras e funcionais dos tecidos (BISWAS & HUTCHINS, 2007). A principal característica destas células é a divisão celular assimétrica, ou seja, uma divisão celular que ocorre a produção de células que se diferenciam e se especializam e células que retêm as características originais das Células-Tronco permanecendo indiferenciadas (YAMASHITA, 2009).

O processo de divisão celular das CTs é controlado por mecanismos gênicos e está correlacionado com a necessidade fisiológica tecidual. Os fatores extrínsecos, coordenados pela interação da célula com o microambiente onde residem também exercem papel fundamental na biologia destas células (MORRISON *et al.*, 1997; SPRADLING *et al.*, 2001). O conhecimento e controle dos diversos mecanismos gênicos podem ser aplicados com finalidade terapêutica (SHERLEY, 2002; LEE *et al.*, 2003; SRIVASTAVA *et al.*, 2008; FOYGEL *et al.* 2008; ASSOUL *et al.*, 2009).

As CTs são definidas como: totipotente, pluripotente e tecido-específica. As CTs totipotentes podem originar todos os tecidos fetais. As CTs pluripotentes podem originar todos os tecidos de um indivíduo adulto. As CTs tecido específicas são obtidas de um tecido adulto e tem a capacidade de diferenciar-se nas células deste tecido (ZAGO, 2007; BAJADA *et al.*, 2008).

2.1.1 Células-Tronco embrionárias

As CTs embrionárias são células capazes de formar os três folhetos germinativos do embrião formando os diferentes tipos de tecidos de um indivíduo adulto sendo assim, são definidas células pluripotentes. São obtidas da massa celular interna do embrião mamífero no estágio de blastocisto no quarto ou quinto dia após a fecundação (BISWAS & HUTCHINS, 2007; FOYGEL *et al.*, 2008).

As primeiras linhagens de CTs embrionárias humanas foram isoladas de embriões frescos e congelados doados, através de consentimento informado, e cultivados até a fase de blastocisto (THOMSON *et al.*, 1998). A capacidade dessas células de se multiplicar em cultura sem perder o estado indiferenciado, assim como a possibilidade de induzir sua diferenciação em tipos celulares específicos, caracteriza-as como células embrionárias e tornou-as uma promissora fonte de tecidos para transplante e de modelos para estudo do processo de diferenciação destas células nos tecidos adultos. (KELLER, 1995; MCDONALD *et al.*, 1999; KAUFMAN *et al.*, 2001; LUMELSKY *et al.*, 2001; ZHANG & PASUMARTHI, 2008).

2.1.2 Células-Tronco adultas

As CTs adultas possuem a capacidade de diferenciação celular mais limitada do que as CTs embrionárias. São capazes de diferenciar-se em células especializadas do tecido do qual derivam, sendo responsáveis pela remodelação, manutenção da integridade e pelo reparo de tecidos específicos. São assim denominadas Multipotentes. (BAJADA *et al.*, 2008).

A maioria dos tecidos adultos possui células com capacidade de multiplicar-se, diferenciando-se naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantendo esta própria reserva de células indiferenciadas (MARSHMAN *et al.*, 2002). Apesar das CTs adultas,

identificadas até o momento, não serem classificadas como pluripotentes, algumas células isoladas de tecidos adultos possuem capacidade de diferenciação mais ampla como as CTs mesenquimais (PITTENGER *et al.*, 1999; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2006).

2.2 Células-Tronco Hematopoéticas

As Células-Tronco Hematopoéticas são CTs adultas capazes de auto-renovação e de darem origem a todas as células especializadas do Sangue Periférico (MORRISON *et al.*, 1995). O conceito de existência das Células-Tronco Hematopoéticas (CTHs) multipotentes originou-se dos estudos, feitos em meados do século XX em camundongos irradiados, onde se observou que a proteção do baço (tecido hematopoético) contra os efeitos radioativos garantia a produção das células sanguíneas (JACOBSON *et al.*, 1949). Posteriormente, Till & McCulloch demonstraram a capacidade das CTHs de formarem colônias esplênicas, contendo células do sangue, ao injetarem uma única CTH em camundongos irradiados que tiveram o baço previamente protegido (TILL & MCCULLOCH, 1961). Desde então, técnicas laboratoriais, baseadas em culturas celulares, foram desenvolvidas para a caracterização das CTHs e Progenitoras. O ensaio de células iniciadoras de cultura a longo prazo (long term culture-initiating cells, LTC-IC) e de CFU-GM (Unidade Formadora de Colônia – Granulócitos e Macrófago, do inglês Colony Forming Units- Granulocyte-Macrophage) são exemplos destes ensaios (METCALF, 1977; SUTHERLAND *et al.* 1990).

A expressão de fenótipos de famílias de receptores celulares e antígenos, presentes na membrana celular, têm sido estudados com o objetivo de identificação e localização das CTHs (KIEL *et al.*, 2005; WAGERS, 2005). Alguns marcadores de superfície têm sido utilizados para identificação das CTHs humanas, que pode ser definido como CD34⁺, Lin⁻, CD38^{-/low}, Thy1⁺ (BAUM *et al.* 1992; MORRISON *et al.*, 1995, PASSEGUÉ *et al.* 2003). O

antígeno CD34, presente na membrana celular e responsável pela adesão celular, é uma glicoproteína que tem um importante papel como marcador fenótipo (SUTHERLAND *et al.*, 1993). O conjunto de quatorze proteínas de superfície que são encontrados nas células maduras é definido como Marcadores para Linhagem (Lin). O antígeno CD38 é uma glicoproteína presente em progenitores maduros, linfócitos B, T e NK com importante papel na adesão celular e regulação do cálcio intracelular. A proteína CD90 (Thy) presente nas CTHs, nas células mesenquimais, pró-timócitos, células NK entre outras células tem importante papel na interação e adesão entre as células e co-estimulação de linfócitos T (COVAS, 2007).

2.2.1 Ontogenia

Os sítios de produção hematopoética mudam durante a ontogenia dos vertebrados (CUMANO & GODIN, 2001). As ilhotas sanguíneas do saco vitelino extra-embriônicos são as primeiras regiões hematopoéticas do embrião humano. Enquanto a região da esplancopleura é o primeiro sítio intra-embriônico (CUMANO & GODIN, 2001). A produção hematopoética no saco vitelino ocorre a partir do 16º dia e na região da esplancopleura por volta de 25º dia de vida. As CTHs destes dois sítios possuem características diferentes em relação à capacidade de auto-renovação e multipotencialidade (CUMANO & GODIN, 2001). O fígado fetal passa a receber as CTHs destes dois sítios por volta de 30º dia de vida e torna-se o principal órgão produtor das células sanguíneas, enquanto o primórdio do timo começa a produção de linfócitos T (TAVIAN *et al.* 1999). Durante a gestação a produção hepática regride mudando o sítio de produção para o baço e finalmente para a Medula Óssea (MO). Após o nascimento, a MO se torna o principal sítio de localização e produção das células sanguíneas (GODIN & CUMANO, 2002).

2.2.2 Microambiente Medular

A MO é composta por dois sistemas que produzem linhagens de células distintas: o sistema hematopoético e o tecido conectivo (estromal) que oferece suporte, e está associado ao sistema hematopoético (Figura 1). A interação destas duas linhagens proporciona a formação de microambientes celulares (nichos) que promovem o processo de diferenciação das CTHs. Estes microambientes são regulados pela interação direta das células e por fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, que são produzidos por várias células hematopoéticas e não hematopoéticas (JANOWSKA-WIECZOREK *et al.* 2001).

Alguns estudos demonstram a relação do nicho ocupado pelas CTs e o seu comportamento (FUCHS *et al.*, 2004; SUDA *et al.*, 2005). Embora a maioria das CTHs apresenta-se localizadas próxima à região endosteal, algumas CTHs associam-se ao endotélio sinusoidal demonstrando a ocupação de mais de um nicho em um mesmo tecido (KIEL *et al.* 2005; ADAMS & SCADDEN, 2006; MORRISON & SPRADLING, 2008). A organização da MO demonstra que o processo ontogênico das CTHs ocorre devido à formação de microambientes e explica a ativação de sítios extra medulares em condições fisiológicas anormais (MORRISON & SPRADLING, 2008).

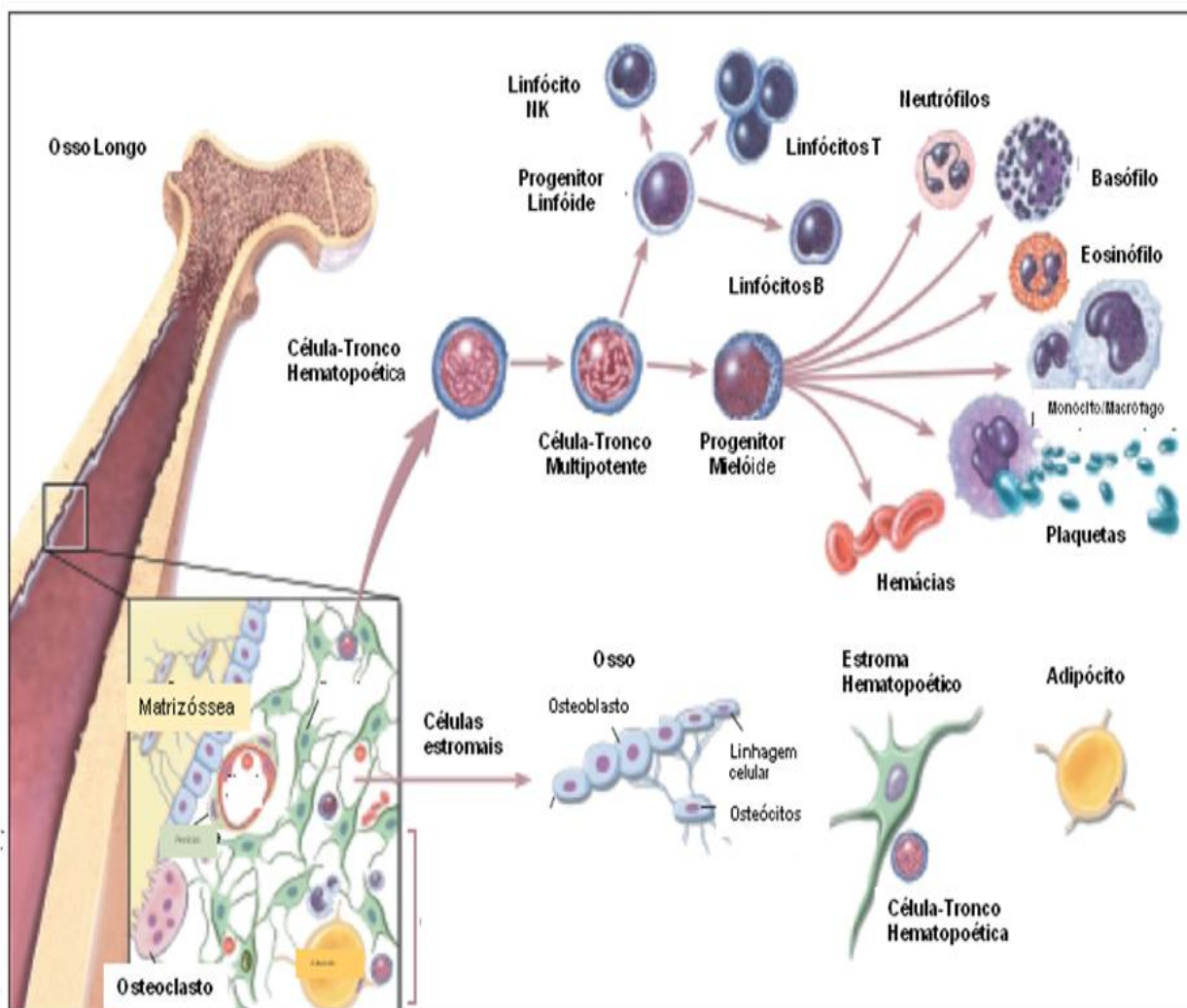


Figura 1. Célula-Tronco Hematopoética e a interação com microambiente medular: O quadro ampliado mostra um fragmento medular de osso longo e a interação entre células estromais, células do tecido ósseo e células hematopoéticas. Processo de diferenciação/ proliferação (modelo hierárquico) das CTHs pode ser visualizado, de forma resumida, na parte superior da figura (KIRSCHSTEIN & SKIRBOLL, 2001- modificado).

2.2.3 Hematopoese

O processo de diferenciação das CTHs em linhagens de células maduras e diferenciadas (eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos linfócitos B, T e NK) é definido como hematopoese. Em um adulto normalmente são produzidos bilhões de células sanguíneas diariamente (MORRISON *et al.*, 1995). O modelo hierárquico (Figura 2) explica o processo de diferenciação das CTHs.

As CTHs, ao realizarem divisão celular, originam uma célula indiferenciada (auto-renovação), igual à CTH, e uma célula progenitora capaz de formar as células sanguíneas. As Células Progenitoras (CPs) são células derivadas da CTH que se encontram comprometidas com o processo de diferenciação celular, porém possuem capacidade de auto-renovação reduzida em relação às CTHs. As Células Precursoras, derivadas das CP, são reconhecidas pelas características morfológicas, possuem baixa capacidade de auto-renovação e elevada atividade mitótica produzindo as células maduras do SP (MINTZ *et al.* 1984; LEMISCHKA *et al.* 1986).

A demonstração que as CTHs entram no ciclo de divisão celular, podendo retornar ou não ao estado de quiescência, e a interação complexa destas células com o microambiente celular que as envolve tem sido investigada (CHESHIER *et al.* 1999; GOTHOT *et al.* 1998; SUMMERS *et al.*, 2001). Assim, propõe-se que a combinação de fatores reguladores externos e alterações fenotípicas, que ocorre durante a fase do ciclo de divisão da CTH, permitam a sobrevivência ou não da célula, mantenha ou não o estado de repouso, ou permita a diferenciação celular (QUESENBERRY *et al.*, 2002; COLVIN *et al.* 2004).

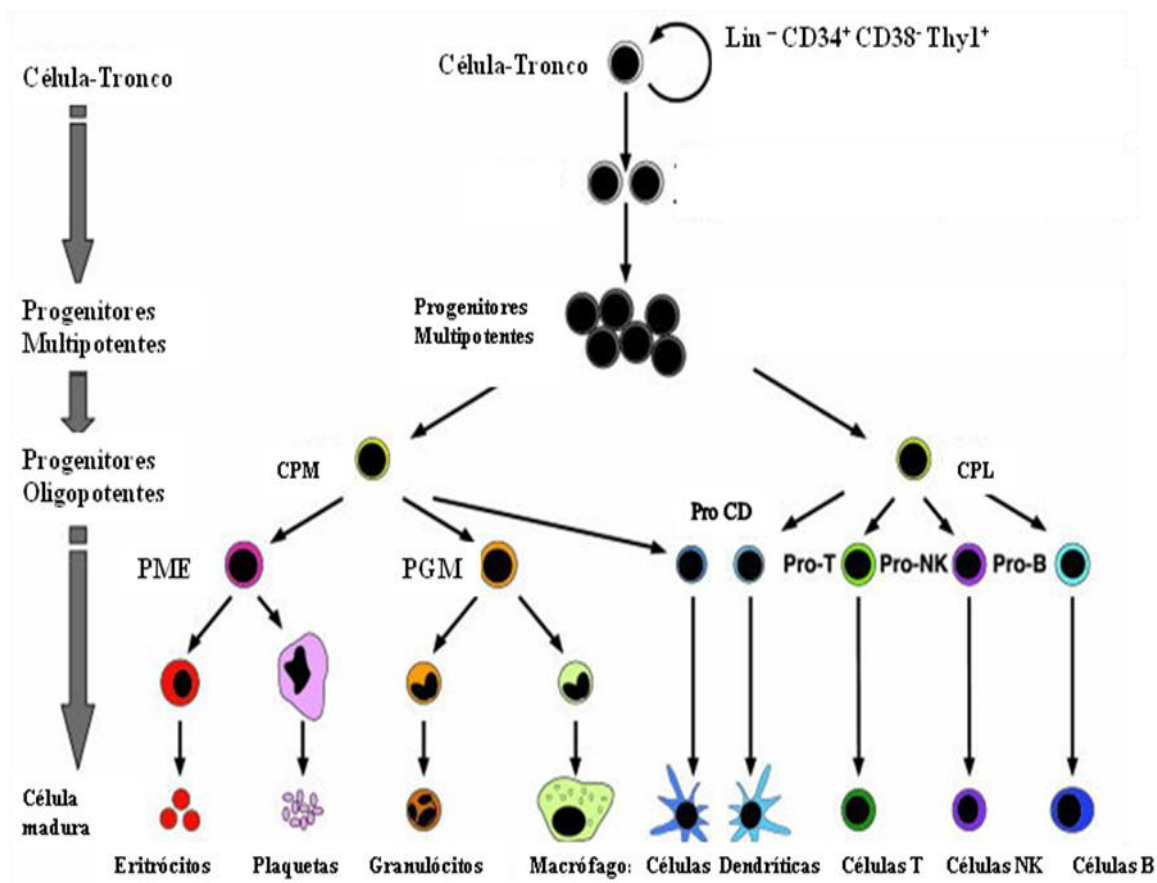


Figura 2. Hierarquia do Sistema Hematopoético. As células sanguíneas maduras surgem de um precursor comum (Célula-Tronco Hematopoética), através de várias etapas de maturação. A CTH possui capacidade de auto-renovação, esta capacidade é perdida ao longo do processo de diferenciação. CPM= Célula Progenitora Mielóide; CPL=Célula Progenitora Linfóide origina as Células Dendríticas, Linfócitos T, B e NK; PME= Progenitores Megacariócitos/Eritrócitos origina Megacariócitos, Eritrócitos e Plaquetas; PGM= Progenitores Granulócitos/Monócitos origina Granulócitos, Monócitos/Macrófagos; Ambos CPM e CPL dar origem a Célula Dendrítica (PASSEGUÉ *et al.* 2003- modificado).

2.3 Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas

As consequências do efeito da irradiação nuclear, durante os ataques da Segunda Guerra Mundial, atingiram um grande número da população das cidades de Hiroshima e Nagasaki. Entre os efeitos da irradiação nuclear destaca-se a aplasia medular. Assim, surgiu o interesse pelo transplante de MO como opção terapêutica para o tratamento das vítimas com aplasia e disfunções medulares (PERRY & LINCH, 1996). Posteriormente, os experimentos de Jacobson *et al.* demonstraram que nos camundongos, em que o baço foi protegido, a reconstituição hematopoética ocorreu mesmo após a exposição à irradiação ionizante em doses letais (JACOBSON *et al.*, 1949). Alguns anos depois, Lorenz *et al.* demonstraram que esta proteção também ocorria quando se infundia MO por via intravenosa (LORENZ *et al.*, 1951). Na década de 50, Thomas *et al.* descreveram o transplante com CTHs e progenitoras da MO (THOMAS *et al.*, 1957). Desde então esta modalidade terapêutica vêm sendo empregada na recuperação hematopoética, após tratamento com quimioterapia em altas doses, de pacientes com diversas patologias oncológicas (VOSE & ARMITAGE, 1993; LUCIDARME *et al.*, 1998; SUREDA *et al.*, 2001; HAHN *et al.*, 2003; SPECCHIA *et al.*, 2006; ATTAL & HAROUSSEAU, 2007; MEHTA & SINGHAL, 2008).

O transplante é classificado de acordo com o tipo de doador em: autólogo, alogênico, singênico e xenogênico (RIFÓN, 2006). O transplante autólogo consiste em extrair e criopreservar as CTHs e progenitoras do próprio paciente e reinfundi-las após o condicionamento com quimioterapia em altas doses (RIFÓN, 2006). No transplante alogênico o doador é um indivíduo da mesma espécie com diferenças genéticas em relação ao receptor, porém com compatibilidade parcial do complexo de histocompatibilidade maior. O Transplante singênico é considerado um tipo de transplante alogênico entre irmãos gêmeos univitelinos (RIFÓN, 2006). No transplante xenogênico o doador e o receptor não são da mesma espécie.

O Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) estima que cerca de 50.000 transplantes de CTHs são realizados, anualmente, no mundo. Trinta por cento destes transplantes ocorrem na América do Norte, Figura 3. Dados do European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), no ano de 2007, estimam que o número de transplantes de CTHs realizados na Europa, anualmente, é aproximadamente 23.500, sendo 9012 alogênicos e 14.524 autólogos (HOŁOWIECKI, 2008).

A opção pela terapia com transplante e o tipo de transplante a ser usado depende da doença de base, resposta da doença ao tratamento com quimioterápicos e ou radioterapia, idade do paciente, presença de comorbidades e a possibilidade de doador (HOŁOWIECKI, 2008). Entre as complicações mais importantes deste procedimento destacam-se a aplasia medular, a toxicidade dos regimes de condicionamento, em especial a toxicidade gastrointestinal, a toxicidade dos agentes crioprotetores, as infecções por microorganismos e a doença do enxerto versus hospedeiro (RIFÓN, 2006). O controle destas complicações tem diminuído a mortalidade deste procedimento contribuindo para a evolução terapêutica do transplante de CTHs (NUCCI *et al.*, 2003).

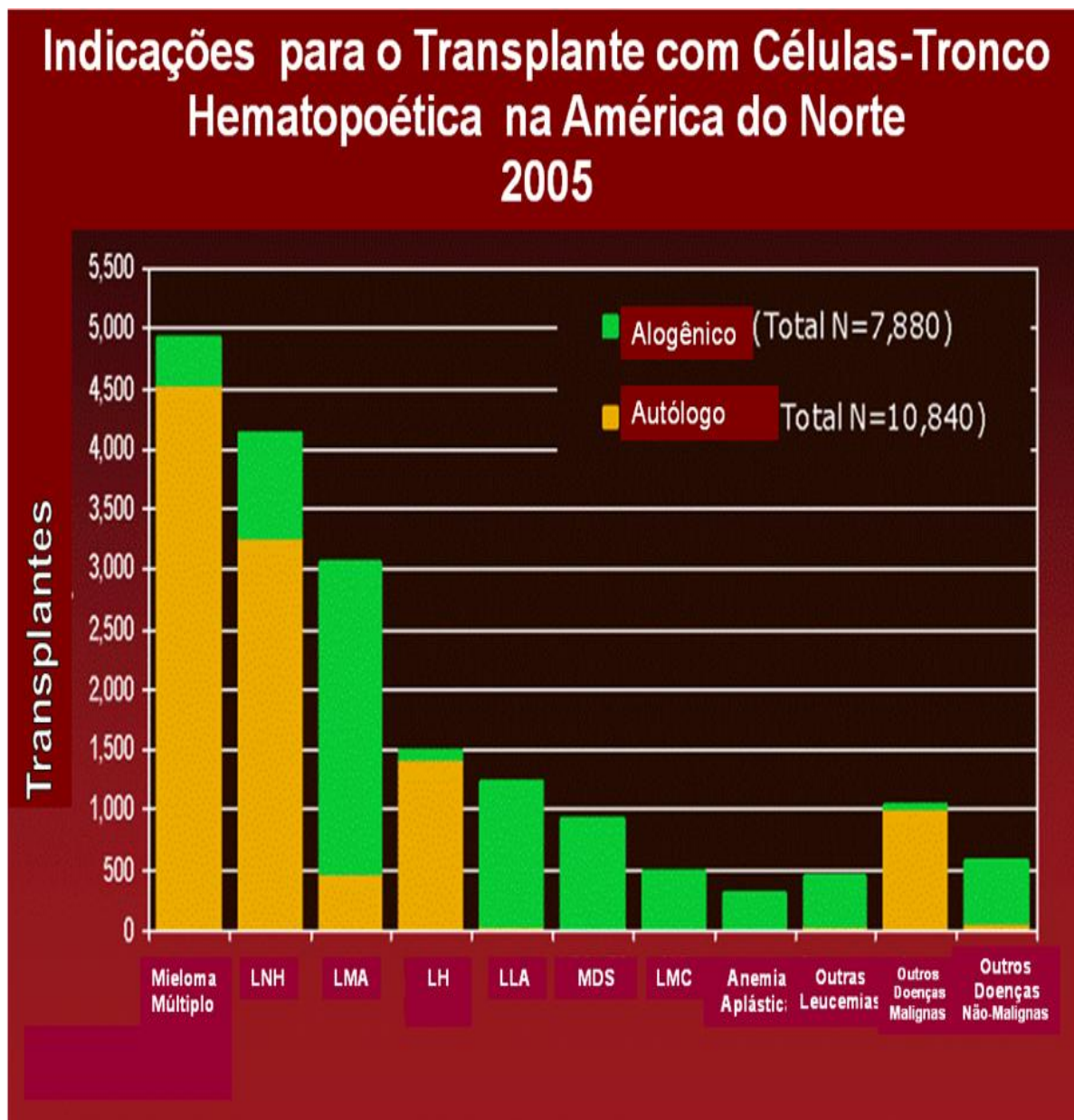


Figura 3. Indicações para o Transplante com Células-Tronco Hematopoética na América do Norte, 2005. LNH =: Linfoma Não-Hodgkin; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LH: Linfoma de Hodgkin; LLA: Leucemia Linfóide Aguda; MDS: Mielodisplasia; LMC: Leucemia Mielóide Crônica. Centro de Estatística do CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research disponível no site:

http://www.marlow.org/PHYSICIAN/Tx_Indications_Timing_Referral/Diseases_Treatable_by_HCT/index.html >>. acessado em: 10 de maio de 2009.

2.4 Fontes de Células-Tronco Hematopoética

As CTHs são raras e após o nascimento, estas células localizam-se, preferencialmente, na MO (GODIN & CUMANO, 2002). No estado basal, o número de CTHs no Sangue Periférico (SP) é muito menor do que o encontrado na MO, porém, o uso de agentes mobilizadores aumenta o número de CTHs em circulação (HOHAUS *et al.* 1998). O sangue do cordão umbilical também tem sido utilizado como fonte destas células. A comprovação da presença das CTHs no sangue de cordão umbilical e a capacidade destas células em reconstituir o sistema hematológico de pacientes com neoplasias hematológicas possibilitaram o uso do sangue de cordão umbilical para transplante em diversas patologias (BROXMEYER *et al.*, 1989; GLUCKMAN *et al.*, 1989; HAYLOCK & NILSSON, 2007; GLUCKMAN & ROCHA, 2009).

2.4.1 Células-Tronco e Progenitoras da Medula Óssea

Os primeiros transplantes utilizaram como fonte de CTHs a MO. A coleta nesta fonte é feita em Centro Cirúrgico, onde o paciente é submetido à anestesia geral e as células são colhidas por múltiplas aspirações da MO da crista ilíaca superior (PAMPHILON, 2004). O volume de células colhido é de cerca de 20 mL por kilograma (Kg) do doador. A quantidade de células colhidas é variável, no entanto, estudos anteriores estimam que seja necessário no mínimo 2×10^6 células CD34⁺ por Kg do receptor para a recuperação hematopoética completa, após a reinfusão das células colhidas (PAMPHILON, 2004).

2.4.2 Células-Tronco e Progenitoras Mobilizadas para o Sangue Periférico

A utilização do sangue periférico como fonte de CTHs para transplante foi considerado um avanço na terapia com transplante (KESSINGER & ARMITAGE, 1991; WATANABE *et al.* 1997; DEMIRER *et al.* 1999; JANSEN *et al.* 2002). A descoberta que as citocinas ou fatores de crescimento mobilizam as CTHs e Progenitoras para o SP propiciou a produção de formas recombinantes destes fatores (KROSCHINSKY *et al.* 2008). A administração de agente quimioterápico e citocinas como o G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos, do inglês Granulocyte colony- stimulating factor) e o GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês Granulocyte-Macrophage colony- stimulating factor) potencializa a mobilização de CTHs para o SP, porém, aumenta o risco de neutropenia, infecção e custo com a hospitalização (NERVI *et al.*, 2006; ARSLAN & MOOG, 2007).

A coleta destas células pode ser realizada por acesso venoso duplo utilizando aparelho de leucaférese ou separador de células com fluxo contínuo (NOROL *et al.* 1993). Além da vantagem de uma obtenção menos traumática, por meio de aparelhos de leucaférese e acesso venoso, a quantidade de CTHs obtidas após mobilização é superior à obtida pelo punção direta da MO (MOOG, 2004; ARSLAN & MOOG, 2007).

O antígeno de superfície CD34 tem sido utilizado com sucesso como parâmetro preditor para recuperação hematopoética e início do procedimento de coleta (SIENA *et al.*, 1989; KRÖGER *et al.*, 2000). A coleta das CTHs inicia-se após a análise das células CD34⁺ do sangue periférico por citometria de fluxo (SUTHERLAND *et al.*, 1996; GRATAMA *et al.* 1998). O objetivo é a coleta de no mínimo 2×10^6 células CD34⁺/ Kg do receptor, em até três aféreses consecutivas, para a recuperação hematopoética completa após a reinfusão destas células (MENDRONE *et al.*, 2008). Möhleo *et al.* analisaram a forte correlação entre o valor

de células CD34⁺/μL do SP e a quantidade de células CD34⁺/Kg colhida no procedimento de leucáfereze. Os autores estimaram como necessário o nível entre 10-30 CD34⁺/μL, no SP, para alcançar a concentração de 2,5x10⁶ células CD34⁺/Kg em três leucáferezes (MÖHLEO *et al.*, 1996).

2.5 Criopreservação

Em determinadas situações, como no transplante alogênico, as CTHs e progenitoras podem se infundidas frescas. No transplante autólogo a criopreservação e estocagem destas células são necessárias para posterior utilização. O conhecimento dos mecanismos físico-químicos que ocorrem durante o congelamento e descongelamento é de suma importância para manter a estrutura e a integridade funcional das células e tecidos congelados (MERYMAN, 2007).

A lesão celular induzida no congelamento se explica pela formação de cristais de gelo, recristalização, vitrificação e pelo crescimento de cristal de gelo intra e extracelular que ocorrem em diferentes temperaturas durante o congelamento. Estes eventos podem ocasionar prejuízos às células por mecanismos diretos ou por intermédio do desequilíbrio osmótico nos meios intra e extracelular (SUMIDA, 2006). Se por um lado o congelamento lento predispõe a formação de cristais de gelo e o crescimento destes no meio extracelular ocasionando o desequilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular, por outro, o congelamento rápido propicia a formação de gelo intracelular que também é prejudicial à célula (PEGG, 2006).

A relação entre a velocidade de congelamento e os eventos que ocorrem durante a criopreservação foram postulados por Leibo e Mazur em 1971. Equações foram desenvolvidas para descrever a cinética de movimentação da água nos meios intra e extracelular, permitindo prever a probabilidade do congelamento intracelular para cada tipo celular em função da velocidade de congelamento (MAZUR, 1984).

O processo de criopreservação é composto por etapas como: Coleta das CTHs da MO ou SP; Adição de crioprotetores; Congelamento; Controle da viabilidade; Estocagem; Descongelamento e Reinfusão (BERZ *et al.*, 2007). A Figura 4 ilustra as diversas etapas do processo de criopreservação das CTHs.

Entre os fatores que afetam a eficácia da criopreservação destacam-se a velocidade do congelamento, a concentração do agente crioprotetor, o controle da temperatura durante a adição do agente crioprotetor com as células e o aumento da concentração celular (PAMPHILON, 2004).

A utilização de protocolos que utilizam crioprotetores e controle da temperatura de congelamento visa diminuir as perdas celulares por mudanças de temperatura inerentes ao processo de congelamento (PEGG, 2006).

A estocagem das CTHs congeladas pode ser realizada em refrigerador mecânico à -80°C ou em tanques com nitrogênio líquido à -196 °C. (GALMÉS *et al.* 1999). O tempo que as CTHs podem ser estocadas, sem prejuízos para a viabilidade, é desconhecido. No entanto, estudos demonstram que a estocagem em nitrogênio líquido propicia um maior tempo de estocagem sem afetar a qualidade das CTHs (PEREZ-OTEYZA *et al.*, 1998; KOBYLKA *et al.* 1998; DONNENBERG *et al.*, 2002; BROXMEYER *et al.*, 2003). O descongelamento das células é realizado em banho de imersão a 37°C. A reinfusão destas células ocorre, imediatamente, após o descongelamento (RÖLLIG *et al.* 2002).

Alguns ensaios têm sido empregados como fator preditor do potencial de recuperação hematopoética como: a viabilidade celular, o ensaio de clonogenicidade (CFU-GM), a contagem de células nucleadas, a contagem de células mononucleares e a contagem de células CD34⁺ (FIETZ *et al.* 2002; FEUGIER *et al.* 2003; XIAO & DOOLEY, 2003; YANG *et al.* 2005).

A manipulação das células em ambiente estéril, dentro de procedimentos e normas regulamentados visa diminuir a contaminação microbiana durante a criopreservação. A avaliação de testes de hemocultura durante as etapas do procedimento de criopreservação é de suma importância para diminuir o risco de infecção no período de recuperação hematopoética após o transplante (BERZ *et al.*, 2007).

Após a reinfusão das CTHs e durante a recuperação hematopoética, alguns procedimentos e cuidados dos profissionais da saúde são necessários. A administração de G-CSF para a aceleração da recuperação hematopoética, a administração de antibioticoterapia preventiva e a transfusão de hemocomponentes para controle da anemia e plaquetopenia visa a diminuir o risco de mortalidade ocasionada pelo tratamento com quimioterapia em altas doses e transplante autólogo (NUCCI *et al.*, 1997; DE AZEVEDO *et al.*, 2002; SAUERHEILBORN *et al.*, 2004).



Figura 4. Etapas do Processo de Criopreservação das CTHs. CTHs: Células-Tronco Hematopoéticas; CFU-GM: Unidade Formadora de Colônia Granulócitos e Macrófago.

2.6 Crioprotetores

O desequilíbrio osmótico tem como consequências a lesão da membrana celular e por vezes a ruptura e morte celular. Os agentes crioprotetores aumentam a concentração de soluto e reduzem as diferenças de osmolaridade, protegendo as células dos efeitos deletérios do desequilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular (MERYMAN, 2007).

Os efeitos crioprotetores do Dimetilsulfóxido (DMSO) foram propostos por Lovelock e Bishop (LOVELOCK & BISHOP, 1959). A maior vantagem deste agente é a capacidade de difusão rápida para o interior das células e a baixa toxicidade celular, embora efeitos clínicos tais como; náusea, vômito, cólica, diarreia, arritmia, hipertensão são observados e proporcionais a dose de DMSO administrada durante o transplante (ALESSANDRINO *et al.*, 1999; ZENHÄUSERN *et al.*, 2000; BENEKLI *et al.*, 2000; WINDRUM & MORRIS, 2003).

A proporção de DMSO usado nos protocolos de criopreservação é 10% do volume total do material a ser infundido. Protocolos que visam à diminuição da quantidade de DMSO infundida têm sido testados, e têm importante aplicabilidade em pacientes pediátricos (CURCOY *et al.*, 2002; AKKÖK *et al.* 2009). Estudos avaliam o uso de menor concentração de DMSO em combinação com outros crioprotetores como o hidroxietilamido, do inglês hidroxietil starch (HES) (STIFF *et al.*, 1987; HALLE *et al.*, 2001; ABRAHAMSEN *et al.*, 2002; IANNALFI, *et al.* 2007; AKKÖK *et al.*, 2008).

2.7 Concentração Celular

A quantidade de CTHs obtidas após mobilização é superior à obtida pelo punção direto da MO (MOOG, 2004; ARSLAN & MOOG, 2007). Os protocolos de criopreservação das células obtidas da MO utilizam a concentração celular máxima de $0,2 \times 10^8$ céls./mL (BAKKEN, 2006). A concentração elevada da CTHs colhidas da MO

resultaria no congelamento de uma única bolsa de sangue por consequência aumentaria o risco de perdas do material em situações não previstas como o rompimento ou quebra da bolsa de congelamento. A criopreservação das células mobilizadas para o SP com a concentração celular de $0,2 \times 10^8$ céls./mL resultaria em grande volume do produto final e proporcionalmente do volume de DMSO a ser infundido. Apesar da falta de padronização no uso de protocolos de criopreservação de CTHs mobilizadas para o SP, a concentração celular da até 2×10^8 células/mL é utilizada por diversos Centros de Transplante do Mundo (WINDRUM *et al.* 2005; BAKER, 2006).

2.7.1 Estudos com Concentração Celular até 2×10^8 células/mL

Perseghin *et al.* avaliaram 23 produtos de leucaféreses, criopreservados até 2×10^8 células/mL, quanto à recuperação da viabilidade celular e dos progenitores CFU-GM, CFU-GEMM e BFU-E. Neste estudo, o congelamento das CTHs mobilizadas até a concentração celular de 2×10^8 células/mL não prejudicou a viabilidade celular e nem da recuperação dos progenitores CFU-GM, CFU-GEMM e BFU-E (PERSEGHIN *et al.* 1997).

Kawano *et al.* estudaram o efeito da concentração celular em protocolos que utilizam 5% de DMSO e congelamento rápido, em refrigeradores sem controle de temperatura de congelamento. Dois protocolos de congelamento com concentração celular entre $0,2$ a $0,5 \times 10^8$ células/mL e 2×10^8 células/mL foram comparados quanto à viabilidade celular após o descongelamento, a recuperação dos progenitores CFU-GM e o tempo para a recuperação hematopoética após o transplante com CTHs mobilizadas para o SP. Os autores demonstraram que a concentração celular de 2×10^8 células/mL não prejudica a viabilidade celular, a recuperação dos progenitores CFU-GM e nem a recuperação hematopoética dos pacientes, quando comparados com o protocolo com $0,2$ a $0,5 \times 10^8$ células/mL (KAWANO *et al.*, 2004).

2.7.2 Estudos com Concentração Celular acima de 2×10^8 células/mL

Na tentativa de diminuir os custos com o procedimento de criopreservação e a toxicidade da infusão de grande volume de DMSO, protocolos de criopreservação que utilizam concentração celular alta têm sido avaliados.

O primeiro estudo avaliando o efeito do aumento da concentração celular durante a criopreservação das CTHs foi publicado por Rowley *et al.* em 1994. Neste estudo, 108 produtos de leucáfêreses, criopreservados com concentração média de $3,7 \times 10^8$ células/mL ($0,4-8,0 \times 10^8$ células/mL) foram analisados quanto à viabilidade celular após o descongelamento e a recuperação da viabilidade celular e dos progenitores CFU-GM. Os autores demonstraram não haver correlação estatisticamente significativa entre o aumento da concentração celular criopreservada, a viabilidade das células mononucleares após o descongelamento, a recuperação das células nucleadas, a recuperação dos progenitores CFU-GM e a recuperação das células CD34⁺. No mesmo estudo, os autores avaliaram o efeito do aumento da concentração celular criopreservada em amostras obtidas de produtos de leucáfêreses, do mesmo paciente, concentradas de duas a vinte e quatro vezes. Os resultados desta análise pareada demonstraram que o aumento da concentração celular no congelamento de CTHs prejudica a recuperação dos progenitores eritróides BFU-E (Explosão/Surgimento de Unidade Formadores-Eritrócitos). Pacientes que receberam transplante com produtos de leucáfêreses, criopreservados com concentração média de $3,8 \times 10^8$ células/mL, e pacientes que receberam transplante de MO, com a concentração média de $0,71 \times 10^8$ células/mL foram avaliados quanto ao tempo para recuperação dos neutrófilos e plaquetas após transplante autólogo. O aumento da concentração celular criopreservada não demonstrou ter influência para a recuperação hematológica após o transplante autólogo (ROWLEY *et al.*, 1994).

Cabezudo *et al.* realizaram um estudo compreendido em três fases onde predominou a análise pareada. Na primeira fase, dezenove produtos de leucáfêreses foram observados

quanto à viabilidade após o descongelamento, a recuperação da viabilidade celular e da capacidade clonogênica dos progenitores CFU-GM. Duas alíquotas foram retiradas de cada produto de leucaféreses e criopreservadas em diferentes concentrações com mediana de $0,94 \times 10^8$ células/mL e $2,91 \times 10^8$ células/mL, respectivamente. Na segunda fase do estudo, 21 produtos de leucaféreses foram criopreservados em diferentes concentrações com mediana de $0,90 \times 10^8$ células/mL e $3,32 \times 10^8$ células/mL e foi analisada quanto à viabilidade após o descongelamento, a recuperação da viabilidade celular e da capacidade clonogênica dos progenitores CFU-GM. Os resultados do estudo demonstram que a alta concentração celular no congelamento prejudica a recuperação da viabilidade celular, mas não prejudica a capacidade clonogênica dos progenitores. Na terceira fase do estudo, o tempo para a recuperação de granulócitos e plaquetas de dez pacientes que realizaram transplante autólogo com os produtos de leucaféreses congelados com a mediana de $2,4 \times 10^8$ células/mL (1,5-4,7) foi comparado com dez pacientes que receberam transplante com 1×10^8 células/mL. O aumento da concentração celular criopreservada não demonstrou ser influente para a recuperação hematológica após o transplante autólogo (CABEZUDO *et al.* 2000).

Martin-Henao *et al.* desenvolveram um estudo retrospectivo envolvendo a análise de 1065 produtos de leucaféreses obtidas de 450 pacientes. Dois protocolos, utilizados para o congelamento da CTHs mobilizadas para o SP, foram avaliados quanto à viabilidade celular, a recuperação da viabilidade celular e a capacidade clonogênica dos progenitores CFU-GM. A mediana da concentração celular no protocolo A foi de $0,82 \times 10^8$ células/mL (0,12-1,56) e no protocolo B foi de $1,56 \times 10^8$ células/mL (0,16-6,78). O protocolo B, com maior concentração, resultou em prejuízo a viabilidade celular e a capacidade clonogênica dos progenitores CFU-GM. No entanto, a mediana do tempo para recuperação hematopoética não foi estatisticamente diferente entre os grupos de pacientes que receberam transplante autólogo com produtos criopreservados nos protocolos avaliados (MARTIN-HENAO *et al.* 2005).

Tabela 1. Estudos publicados que avaliaram o efeito da concentração celular na recuperação celular e hematopoética.

| Autor | Ano | Nºde pacientes | CC (Min.-Máx.) | Viab. celular | Recuperação da viabilidade | Recuperação dos progenitores | Capacidade Clonogênica | Recuperação in vivo |
|-----------------------------------|------------|---------------------------|---|--------------------------|---|---|-----------------------------------|--------------------------------|
| Rowley <i>et al.</i> | 1994 | 88 | 3,8 (0,4-8,0) | NS | NS* | BFU-E‡ p=0,04 | NA | NS |
| Perseghin <i>et al.</i> | 1997 | NA | 0,4-2,0 | NS | NA | NS‡ | NA | NA |
| Cabezudo <i>et al.</i> | 2000 | 10 | 0,9 (0,45-0,92) vs. 3,32 (1,71-5,82) | p<0,01 | p=0,02† | NA | NS‡ | NS |
| Kawano <i>et al.</i> | 2003 | 86 | 0,2-0,5 vs. 2,0 | NS | NA | NS‡ | NA | NS |
| Martin-Henao <i>et al.</i> | 2005 | 450 | 0,82 (0,12-1,56) vs. 1,83 (0,16-6,78) | p<0,01 | NS† | NA | p<0,01‡ | NS |

C. C.= Concentração Celular; Min. = Mínimo; Máx.= Máximo; Viab.= Viabilidade; Recup.=Recuperação; Recuperação in vivo = Recuperação de Neutrófilos e Plaquetas; BFU-E= Explosão/Surgimento de Unidade Formadores-Eritrócitos; NS= sem diferença estatisticamente significativa; NA= Não avaliado; Capacidade Clonogênica= Número de colônias de CFU-GM por células CD34⁺ plaqueada; * citometria de fluxo; †Método azul de Trypan; ‡Células cultivadas em metilcelulose e meio de Iscove's Modificado.

3 OBJETIVOS

3.1 Principal

Verificar a influência da concentração celular criopreservada sobre a recuperação da viabilidade celular, a recuperação dos progenitores CFU-GM e a cinética da recuperação hematopoética no transplante autólogo.

3.2 Secundários

Comparar os pacientes envolvidos no estudo quanto às variáveis clínicas e do transplante e avaliar a influência destas variáveis clínicas na recuperação celular e hematopoética dos pacientes que receberam transplante autólogo.

Avaliar a correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6 / Kg$ infundida e a recuperação hematopoética.

Avaliar a correlação entre a dose de progenitores $CFU-GM \times 10^4 / Kg$ infundida e a recuperação hematopoética.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 População de Estudo

Pacientes que realizaram terapia com transplante autólogo de CTHs do Sangue Periférico (SP), entre janeiro de 1999 e janeiro de 2007, foram selecionados para o estudo.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Pacientes que realizaram terapia com transplante autólogo de CTHs do Sangue Periférico com produtos de leucaféreses criopreservados com a concentração 1×10^8 células/mL ou 2×10^8 células/mL.

Pacientes que realizaram mais de um transplante tiveram os dados analisados em apenas um dos procedimentos.

A adoção das concentrações celular acima como critério de inclusão foi baseado na necessidade de avaliação de dois protocolos de criopreservação empregados pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Inicialmente, os produtos de leucaféreses eram criopreservados com concentração de 1×10^8 células/mL Posteriormente, a concentração celular adotada para o congelamento passou a serem $\leq 2 \times 10^8$ células/mL

4.1.2 Critérios de Exclusão

- Produtos de leucaféreses criopreservados com concentração diferente dos protocolos estudados.
- Transplante com produtos de leucaféreses criopreservados em mais de um dos protocolos estudados.

4.2 Desenho do Estudo

Este estudo retrospectivo foi conduzido no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) - Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

4.3 Mobilização e Coleta de Células-Tronco e Progenitoras do SP

A mobilização com G-CSF foi feita com 10mg/Kg/dia (duas ampolas de 300 mg/dia) ou etoposídeo 2g/m² por quatro dias (500mg/m²/dia) ou ciclofosfamida 4g/m² (1g/m²/ dia em dias alternados). A coleta das CTHs mobilizadas para o SP iniciou quando no mínimo sete células CD34⁺/μL foram observadas no SP. As células foram coletadas diariamente por meio de um sistema de aférese com fluxo contínuo (Cobe Spectra, Cobe BCT, Lakewood, CO, USA) até a concentração mínima de 2x10⁶ células CD34⁺/Kg, necessária para a reconstituição hematopoética após terapia. Durante uma coleta ou leucaférese foi processado em média quatro vezes o volume de sangue total do doador. Em média foram realizadas duas coletas por doador em dias consecutivos. A solução de glicose e citrato (ACD- glicose monoidratada, citrato de sódio diidratado e ácido cítrico anidro) foi utilizada como anticoagulante durante a coleta.

4.4 Quimioterapia de Altas Doses

Pacientes com Linfoma de Hodgkin e Não – Hodgkin foram tratados com BEAM (Carmustina, Etoposídeo, Citarabina e Melfalan), CBV (Ciclofosfamida, Carmustina e Etoposídeo) ou CBV modificado. Pacientes com Mieloma Múltiplo receberam Melfalan. Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda receberam Bu/Cy (Bussulfan e Ciclofosfamida). Pacientes com tumor de células germinativas foram tratados com Cb/Vp (Carboplatina e

Etoposideo) e um paciente com Sarcoma de Ewing recebeu Bussulfan e Melfalan. Os esquemas de Condicionamento utilizados por doença estão descritos abaixo na Tabela 1.

Tabela 2. Regimes de Condicionamento.

| Doença de Base | Regime de Condicionamento | Descrição |
|--------------------------------------|----------------------------------|---|
| Linfoma de Hodgkin | BEAM | BCNU 300 mg/m ² i.v. no dia -7, etoposideo 200 mg/m ² i.v. diariamente dos dias -6 a -3, citarabina 400mg i.v. diariamente dos dias -6 a -3; melfalan 140 mg/m ² i.v. no dia -2 |
| Linfoma Não – Hodgkin | CBV | ciclofosfamida 1500 mg/m ² i.v. diariamente dos dias -6 a -3; BCNU 300 mg/m ² i.v. no dia -6, etoposideo 200 mg/m ² i.v. de 12/12 horas dos dias -6 a -4, Mitexan 1000 mg/m ² /dia, divididos em 3 doses conjuntas com a administração da ciclofosfamida (-30 min./+4h/+8 horas), in bolus. |
| | CBV modificado | ciclofosfamida 1500 mg/m ² i.v. diariamente nos dias -6 a -3; BCNU 300 mg/m ² i.v. no dia -6, etoposideo 400 mg/m ² i.v. diariamente nos dias -6 até -4 |
| Mieloma Múltiplo | Melfalan | Melfalan 100mg/ m ² i.v. diariamente nos dias -3 e -2 |
| Leucemia Mielóide Aguda | Bu/Cy | Bussulfam 4mg/Kg v.o. diariamente nos dias -7 até -4; ciclofosfamida 60mg/Kg diariamente nos dias -3 e -2 |
| Tumor de células germinativas | Cb/Vp | carboplatina 500mg/ m ² i.v. diariamente nos dias -7, -5 e -3; etoposideo 400 mg/m ² i.v. diariamente nos dias -7, -5 e -3 |
| Sarcoma de Ewing | | Bussulfan 224mg/m ² i.v. diariamente nos dias -4 até -1; Melfalan 140mg/m ² i.v. no dia -1. |

4.5 Criopreservação

No período de tempo avaliado no estudo dois protocolos de criopreservação foram empregados nesta Instituição. Inicialmente, os produtos de leucaféreses eram criopreservados com concentração de 1×10^8 células/mL. Posteriormente, a concentração celular adotada para o congelamento passou a ser $\leq 2 \times 10^8$ células/mL baseado na literatura científica e análises dos produtos de leucáferezes, criopreservados com esta concentração, quanto à recuperação da viabilidade e dos progenitores CFU-GM. Em ambos os protocolos os demais procedimentos para criopreservação das CTHs foram os mesmos.

O material colhido, o qual não foi processado no mesmo dia, foi refrigerado a 4°C até o momento da criopreservação. O ajuste da concentração celular em 1×10^8 células/mL com plasma autólogo foi realizado quando a criopreservação foi iniciada no dia seguinte a coleta. A criopreservação ocorreu no período máximo de 16 horas após a coleta. Após a refrigeração o material colhido foi centrifugado, o excesso de plasma foi retirado de modo a obter a concentração celular final escolhida. Heparina sódica, na concentração de 20U/mL, foi adicionada as células para evitar a formação de coágulos. A solução crioprotetora foi constituída de oito partes de meio de cultura Roswell Park Memorial Institute RPMI (RPMI-1640 Sigma – Aldrich) e duas partes de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor. A concentração final de DMSO no produto a ser congelado foi 10%. A solução crioprotetora e as CTHs foram resfriadas em banho de gelo por 15 minutos e posteriormente misturadas em volume contínuo e controlado durante cinco minutos, mantendo as soluções em plataforma de gelo durante o processo. O produto final foi distribuído em bolsas de etileno acetato de vinila apropriadas para o congelamento em baixa temperatura (Cryocyte Baxter). Cinco alíquotas com média de 1,0 mL são colocadas em criotubos apropriados. As bolsas e os criotubos contendo o produto a ser criopreservado foram congelados em congelador com temperatura programável (Cryogenics, Gordinier Eletronics, INC). A Curva de congelamento da amostra

está representada na Figura 5. Após o congelamento, as bolsas e criotubos foram estocados em nitrogênio líquido à -196°C , sendo estocadas por 24 horas na fase de vapor e subsequente mergulhadas na fase líquida do nitrogênio.

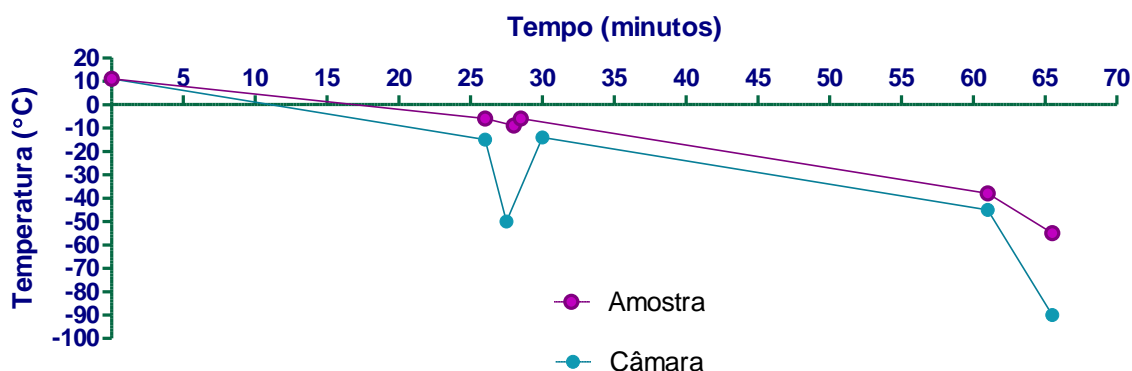


Figura 5. Curva do Congelamento. Congelador com temperatura programável (Cryogenics, Gordinier Eletronics, INC).

4.6 Contagem e Viabilidade celular

A leucometria das amostras sanguíneas foi obtida por método automatizado ou por hemocitômetro. A proporção de mononucleares nos produtos de leucaféreses foi obtida por contagem microscópica de distensão sanguínea coradas com corante de Wright. O teste de viabilidade com azul de trypan foi utilizado para a verificação da viabilidade nas amostras frescas e criopreservadas. Para avaliação da viabilidade celular após o congelamento utilizou-se as amostras congeladas nos criotubos, após o descongelamento a 37°C e diluição seriada de 1:400 em meio de Iscove's (1:20 em meio de Iscove's e 1:20 em meio de Iscove's com 10% de soro fetal bovino). Após a diluição da amostra, processou-se uma diluição 1:2 com Azul de Trypan. Para avaliação da viabilidade celular nas amostras frescas, utilizou-se a suspensão de células proveniente do produto colhido no processo de aférese diluída 1:5 em meio de

Iscove's com 10% de soro fetal bovino. Após a diluição da amostra, processou-se uma diluição 1:2 com Azul de Trypan. A contagem das células vivas e mortas foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de microscopia óptica.

A recuperação da viabilidade foi calculada pela viabilidade obtida, após o descongelamento, dividida pela viabilidade do produto a fresco e multiplicada por 100.

4.7 Contagem das Células CD34⁺

Anticorpos monoclonais, conjugados com substâncias fluorescentes, como CD34-PE (8G12, BD, Biosciences, San Jose, CA), CD45-FITC (2D1, BD, Biosciences, San Jose, CA) controle isótipo IgG PE (Ig G₁, BD, Biosciences, San Jose, CA) foram utilizados na identificação. Após a incubação, por 30 minutos em banho de gelo, com anticorpos, as células foram lavadas e incubadas, por mais 6 minutos sob proteção da luz, com solução de lise (FACS Lysing Solution B&D 10x, soro fetal bovino inativado) para lisar as hemácias. A proporção de células CD34⁺ foi identificada por análise em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA), utilizou-se a estratégia de gates proposta pela ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) e o programa Cell Quest Pro versão 6.0 (SUTHERLAND *et al.*, 1996)

4.8 Ensaio Clonogênico

Ágar em meio de Iscove (Iscove's Modified Dulbecco's Medium- Sigma – Aldrich), suplementado com soro fetal bovino inativado, foi utilizado como meio de cultura para o desenvolvimento deste ensaio. Como fonte de fator estimulante do crescimento de granulócitos-monócitos, utilizou-se meio condicionado da linhagem celular de carcinoma de

bexiga. A concentração de GM-CSF neste meio foi controlada em cada lote produzido e apresentou em média 40U/mL. A concentração celular plaqueada foi de $2-4 \times 10^3$ células/placa. As amostras foram plaqueadas em triplicata. Cada placa foi constituída de duas camadas, denominadas de Camada Básica e Camada Celular. A Camada Básica foi constituída de 0,9 mL de Iscove's, 0,6 mL de soro fetal bovino, 0,6 mL de meio de Iscove's diluído 1:2 e 0,9 mL ágar. A Camada Celular foi constituída de 0,6 mL meio de Iscove's, 0,6 mL de soro fetal bovino, 0,6 mL de Agar, 0,6 mL de meio condicionado da linhagem celular de carcinoma de bexiga, volume da amostra contendo a quantidade de células previamente calculada e meio de Iscove's quantidade suficiente para uma solução final de três mL. Após incubação por 12 dias em estufa a 37°C, em câmara úmida e 5% de saturação de CO₂. As colônias formadas foram contadas com auxílio de microscópio. Foram consideradas colônias os grupamentos de mais de 50 células (PIKE & ROBINSON, 1970; TESTA & MOLINEAUX, 1993).

O ensaio clonogênico foi utilizado para a verificação dos progenitores CFU-GM nas amostras frescas e criopreservadas. Para avaliação dos progenitores CFU-GM, após o congelamento, utilizou-se as amostras congeladas nos criotubos, após o descongelamento a 37°C e diluição 1:20 em meio de Iscove's. Para avaliação dos progenitores CFU-GM, nas amostras frescas, utilizou-se a suspensão de células proveniente do produto colhido no processo de aférese. A recuperação do CFU-GM foi calculada pelo número de CFU-GM, após o descongelamento, dividido pelo número de CFU-GM do produto a fresco e multiplicado por 100.

4.9 Descongelamento e Reinfusão

O transporte do material criopreservado foi realizado em compartimento apropriado onde as bolsas ficaram submersas em nitrogênio líquido até o momento do descongelamento. A velocidade do descongelamento foi rápida para evitar a recristalização de cristais de gelo

intracelular que poderiam prejudicar a viabilidade celular, sendo processada em banho de imersão, com água destilada e temperatura controlada a 37°C. A reinfusão ocorreu imediatamente após o descongelamento das células, para diminuir as perdas celulares relativas à citotoxicidade do DMSO a 37°C. A administração do produto criopreservado ocorreu de cateter venoso central, sendo acompanhada por uma equipe de profissionais de Saúde. A velocidade de infusão foi de duas gotas por segundo (360mL/h). O volume máximo de DMSO infundido deve ser 1,1g/Kg. Produtos de leucáfereses com maior concentração de DMSO foram infundidos em dois ou três dias consecutivos.

4.10 Administração de G-CSF e Tratamento de Suporte

Todos pacientes envolvidos no estudo receberam G-CSF cinco µg/Kg/dia IV, após a reinfusão das CTHs. A administração do G-CSF iniciou-se, geralmente, no D+1 ou no D+5 e foi administrado até a recuperação dos neutrófilos > 1.000/µL. Transfusões de concentrado de hemácias foram realizadas, quando necessário, conforme critérios clínicos. Transfusões de concentrado de plaquetas foram realizadas visando a manter o número de plaquetas no SP acima de 10.000/µL ou conforme critérios clínicos.

4.11 Coleta dos Dados

Os dados referentes ao processo de criopreservação foram obtidos do arquivo do Laboratório de Cultura e Criopreservação de Medula Óssea/ Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho- HUCFF. Os dados clínicos foram obtidos do Prontuário Médico solicitado ao Serviço de Documentação Médica, das fichas de Dados

Clínicos obtidas no Serviço de Hematologia e do Prontuário Médico Informatizado do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho- HUCFF.

4.12 Definição dos Desfechos de Interesse

A neutropenia foi definida como uma contagem absoluta de neutrófilos $\leq 500/\mu\text{L}$.

O dia zero (D0) foi definido como o dia no qual foram infundidas as células progenitoras do sangue periférico. Nos pacientes que receberam as células em dias consecutivos, o dia zero (D0) foi considerado o último dia de reinfusão.

O tempo para a recuperação dos neutrófilos foi definido como o número de dias compreendidos entre o dia da reinfusão das CTHs (D0) e o primeiro dia com contagem dos neutrófilos $\geq 500/\mu\text{L}$ no SP.

O tempo para a recuperação das plaquetas foi definido como o número de dias compreendidos entre o dia da reinfusão das CTHs (D0) e o primeiro dia com a contagem de plaquetas $\geq 20.000/\mu\text{L}$ no SP, sem suporte transfusional.

A duração da neutropenia foi definida como o número de dias com a contagem de neutrófilos $\leq 500/\mu\text{L}$.

A febre associada à neutropenia foi definida como temperatura axilar de 38°C em presença de neutropenia.

Os episódios febris foram classificados como: febre de origem obscura, infecção microbiologicamente documentada com bacteremia, infecção microbiologicamente documentada sem bacteremia, ou clinicamente documentada, conforme critérios publicados (BUCANEVE *et al.* 2005).

4.13 Métodos Estatísticos

Os dados foram coletados e registrados em formulários impresso e padronizado (anexo I e II). Posteriormente, os dados foram registrados em um banco de dados eletrônico gerado pelo programa SPSS 15.0 (versão 15.0, SPSS Inc. Chicago, IL, EUA). A concentração celular foi estudada como variável categórica. Comparações entre dados categóricos foram feitas pelo teste Qui-quadrado, ou de Fisher, quando indicado. Para a comparação de dados numéricos o teste de Mann Whitney foi utilizado. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para construção de curvas de sobrevida das variáveis com medida de tempo. As curvas de sobrevida foram comparadas pelo teste de log-rank. A correlação qualitativa entre as variáveis foi estimada pela correlação de Spearman. As relações entre variáveis e os desfechos do tipo “tempo-para-um-evento” foram examinadas por regressão de Cox univariada e multivariada. A análise da curva de ROC foi utilizada para definir o melhor ponto de corte para as doses de células $CD34^+ \times 10^6/Kg$ e progenitores $CFU-GM \times 10^4/Kg$ como fatores para a recuperação hematopoética. Para todas as comparações feitas, valores p bicaudais menores ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A análise dos dados foi feita SPSS 15.0 (SPSS Inc, EUA).

5 RESULTADOS

Influência da concentração celular na recuperação hematopoética após transplante

5.1 Características dos Pacientes e do Transplante

Duzentos e setenta e cinco pacientes foram incluídos no estudo e tiveram os produtos de leucaféreses criopreservados com concentração 1×10^8 células/ mL (Grupo A; 173 pacientes) ou 2×10^8 células/ mL (Grupo B; 102 pacientes). Todos os pacientes apresentavam doenças hematopoéticas de natureza maligna, exceto três pacientes, dois com câncer testicular e um com Sarcoma de Ewing. Todos pacientes realizaram transplante autólogo, com CTHs mobilizadas para sangue periférico, como terapia para as malignidades. O número de ciclos quimioterápicos e os diferentes regimes administrados antes da terapia com transplante autólogo, o regime de condicionamento, a doença de base, a idade, o sexo, o protocolo de mobilização de CTHs empregado, o dia que se iniciou o G-CSF, o número de células CD34 infundidas, o número de progenitores CFU-GM infundidos, foram considerados como variáveis relevantes neste estudo. Os Grupos (A e B) foram comparados em relação a estas variáveis.

Os Grupos A e B não apresentam diferenças estatisticamente significativas com relação às variáveis clínicas sexo, idade e doença de base, Tabela 3. O protocolo de mobilização com G-CSF, sem quimioterapia, foi empregado em maior proporção dos pacientes do Grupo B (44,5% vs. 79,4%, $p < 0,01$), Tabela 4. Assim como, a adoção mais recente do protocolo de criopreservação B (maior concentração), a mobilização com G-CSF tem sido empregada mais recentemente, justificando a maior proporção de pacientes que utilizaram este protocolo de mobilização no Grupo B. A mediana da dose de DMSO infundida é maior no Grupo A (45 vs. 26,5 mL, $p < 0,05$), devido à menor concentração celular

empregada neste protocolo e, conseqüentemente, maior volume de produto final e de DMSO a ser criopreservado, Tabela 5.

A dose de células CD34⁺/Kg e a dose de progenitores CFU-GM /Kg infundidos foram consideradas como variáveis categóricas em dois níveis, $\geq 3 \times 10^6$ células CD34⁺/Kg e $< 3 \times 10^6$ células CD34⁺/Kg; $\geq 12 \times 10^4$ CFU-GM e $< 12 \times 10^4$ CFU-GM, fundamentada na interpretação da análise da curva ROC, Tabela 6 e Figura 6 e 7. Nesta análise, a dose de $3,3 \times 10^6$ células CD34⁺/Kg infundida e a dose $12,4 \times 10^4$ CFU-GM apresentaram maior sensibilidade e especificidade para a recuperação de neutrófilos até o décimo - primeiro dia após o transplante (D11). As doses definidas para recuperação das plaquetas até o dia décimo - segundo dia após o transplante (D12) e para a duração da neutropenia em sete dias foram próximas a 3×10^6 células CD34⁺/Kg infundida e 12×10^4 CFU-GM/Kg. A definição destes tempos como satisfatório para recuperação hematopoética foi baseado na observação de que mais da metade dos pacientes estudados alcançaram a recuperação de neutrófilos e de plaquetas no D11 e D12, respectivamente. A duração da neutropenia foi de sete dias na maioria dos pacientes estudados. Sabendo-se que o tempo para a recuperação dos neutrófilos, das plaquetas e de duração da neutropenia, na maioria dos pacientes, foi de 11 dias, 12 dias e 7 dias, respectivamente. Calculou-se a dose de CD34⁺/Kg e de CFU-GM/Kg infundidos que apresentou maior área em uma curva ROC, conseqüentemente, a maior sensibilidade e especificidade para os desfechos hematopoéticos analisados (tempo para a recuperação dos neutrófilos, das plaquetas e de duração da neutropenia). Assim, estas doses foram utilizadas para estabelecer, de forma criteriosa, “pontos de corte” ou pontos para categorização destas variáveis. A dose de células CD34⁺/Kg infundida foi categorizada como $> 3 \times 10^6$ e $< 3 \times 10^6$. A dose de progenitores CFU-GM/Kg em $> 12 \times 10^4$ e $< 12 \times 10^4$.

A proporção de pacientes que receberam $< 3 \times 10^6$ células CD34⁺/Kg é maior no grupo B (23,7% vs. 49% $p < 0,01$), Tabela 4. A proporção de pacientes que receberam $< 12 \times 10^4$ /Kg

CFU-GM é maior no grupo B (52 vs. 32,4, $p<0,01$), Tabela 4. A dose de $CD34^+ \times 10^6/Kg$ e $CFU-GM \times 10^4/Kg$ infundido foi obtida do somatório do valor destas variáveis nas bolsas transfundidas. Os pacientes do Grupo A receberam, em mediana, maior dose de $CD34^+ \times 10^6/Kg$ e $CFU-GM \times 10^4/Kg$ em relação ao Grupo B (4,33 vs. 3,05 $p<0,01$ e 18,35 vs. 10,25 $p<0,01$, respectivamente), Tabela 5.

Tabela 3. Características clínicas dos pacientes.

| | Grupo A | | Grupo B | | p^\dagger |
|-------------------------|------------|------|------------|------|-------------|
| | n=173 | % | n=102 | % | |
| Idade* | 47 (11-69) | | 49 (15-68) | | 0,16 |
| Sexo | | | | | |
| Masculino | 102 | 59 | 66 | 64,7 | |
| Feminino | 71 | 41 | 36 | 35,3 | 0,37 |
| Doença de base | | | | | |
| Linfoma de Hodgkin | 50 | 28,8 | 29 | 28,4 | |
| Leucemia Mielóide Aguda | 5 | 2,9 | 2 | 2 | |
| Mieloma Múltiplo | 83 | 48 | 54 | 52,9 | 0,81 |
| Linfoma Não- Hodgkin | 33 | 19,1 | 16 | 15,7 | |
| TCG | 1 | 0,6 | 1 | 1 | |
| Sarcoma de Ewing | 1 | 0,6 | - | - | |

Grupo A (1×10^8 células/mL); Grupo B (2×10^8 células/mL); \dagger Teste Q-Quadrado ou Teste de Mann Whitney; *valor expresso em mediana (mínimo-máximo); TCG = Tumor de Células Germinativas

Tabela 4. Características do Tratamento com Transplante.

| | Grupo A | | Grupo B | | <i>p</i> † |
|--------------------------------|----------|------|----------|------|-----------------|
| | n=173 | % | n=102 | % | |
| Ciclos de qt. prévios* | 8 (2-23) | | 8 (1-19) | | 0,66 |
| Regimes de qt. prévios* | 2 (1-5) | | 2 (1-4) | | 0,91 |
| Mobilização | | | | | |
| G-CSF | 77 | 44,5 | 81 | 79,4 | <0,01 |
| G-CSF+ qt | 96 | 55,5 | 21 | 20,6 | |
| Dia que iniciou G-CSF | | | | | |
| D <5 | 70 | 41 | 39 | 38,4 | 0,40 |
| D ≥5 | 103 | 59 | 63 | 61,8 | |
| Condicionamento | | | | | |
| CBV | 80 | 46,2 | 41 | 40,2 | 0,73 |
| BEAM | 3 | 1,7 | 3 | 2,9 | |
| MEL 200 ou MEL 140 | 83 | 48 | 54 | 52,9 | |
| Outros | 7 | 4,1 | 4 | 4 | |
| Dose CD34⁺ | | | | | |
| ≥3 x10 ⁶ /Kg | 132 | 76,3 | 52 | 51 | <0,01 |
| <3 x10 ⁶ /Kg | 41 | 23,7 | 50 | 49 | |
| Dose GM-CFU | | | | | |
| ≥12x10 ⁴ /Kg | 114 | 65,9 | 47 | 46,1 | |
| <12x10 ⁴ /Kg | 56 | 32,4 | 53 | 52 | <0,01 |

Grupo A (1x10⁸ células/mL); Grupo B (2x10⁸ células/mL); †Teste Q-Quadrado ou Teste de Mann Whitney; * valor expresso em mediana (mínimo-máximo); qt.= quimioterapia; G-CSF = granulocyte colony-stimulating; D≥5 = do quinto dia em diante, após o transplante; D<5 = até o quinto dia após o transplante; CBV= Ciclofosfamida, carmustina e etoposideo; BEAM = carmustina, etoposideo, citarabina e melfalano; MEL 200 = melfalan 200 mg/m²; MEL 400 = melfalan 400 mg/m²; Outros = Bu-Cy- Bussulfan e Ciclosfosfamida; Cbvp- carboplatina e etoposideo; Bussulfan e Melfalan; CFU-GM = Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units

Tabela 5. Características do produto final infundido no transplante.

| | Grupo | Média | DP | Mediana | Min-Máx | p* |
|--|--------------|--------------|-----------|----------------|----------------|-----------------|
| CD34⁺ x10⁶/Kg | A | 5,44 | 4,1 | 4,33 | 1,15-34,27 | <0,01 |
| | B | 4,48 | 3,5 | 3,05 | 1,63-19,9 | |
| CNx10⁸/Kg | A | 7,74 | 4,44 | 6,96 | 1,12-24,7 | 0,71 |
| | B | 7,94 | 4,46 | 7,11 | 1,45-22,35 | |
| MNC x10⁸/Kg | A | 5,63 | 3,05 | 5,14 | 0,99-17,46 | 0,26 |
| | B | 6,10 | 3,30 | 5,74 | 0,81-15,12 | |
| CFU- GM x10⁴/Kg | A | 25,75 | 30,36 | 18,35 | 0,9- 258,3 | <0,01 |
| | B | 17,76 | 18,11 | 10,25 | 1,38-90,9 | |
| Volume de DMSO (mL) | A | 50,78 | 28,34 | 45 | 7-149 | <0,01 |
| | B | 30,35 | 16,58 | 26,5 | 6-82 | |

DP = Desvio Padrão; Min.= Mínimo; *Teste de Mann Whitney; Grupo A = 1×10^8 células/mL (173 pacientes); Grupo B 2×10^8 células/mL (102 pacientes); CN = célula nucleada; MNC = mononucleares; CFU-GM = Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units; DMSO = dimetilsulfóxido.

Tabela 6. Definição da dose de células CD34⁺ e CFU-GM pela curva de ROC.

| Variáveis | Área p-valor** | | Melhor ponto de corte*** | Sensibilidade | 1-Especificidade |
|---|-----------------------|---------|---------------------------------|----------------------|-------------------------|
| CD34 ⁺ x10 ⁶ /Kg* | 0,707 | < 0,001 | 3,3 | 0,70 | 0,6 |
| CFU-GMx10 ⁴ /Kg | 0,642 | < 0,001 | 12,4 | 0,64 | 0,44 |

*Sentido invertido: área equivalente a 0,293, **Hipótese de área da curva ROC = 0,5; ***Ponto que maximiza sensibilidade e especificidade; D11 = Décimo - primeiro dia; CFU-GM = Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units.

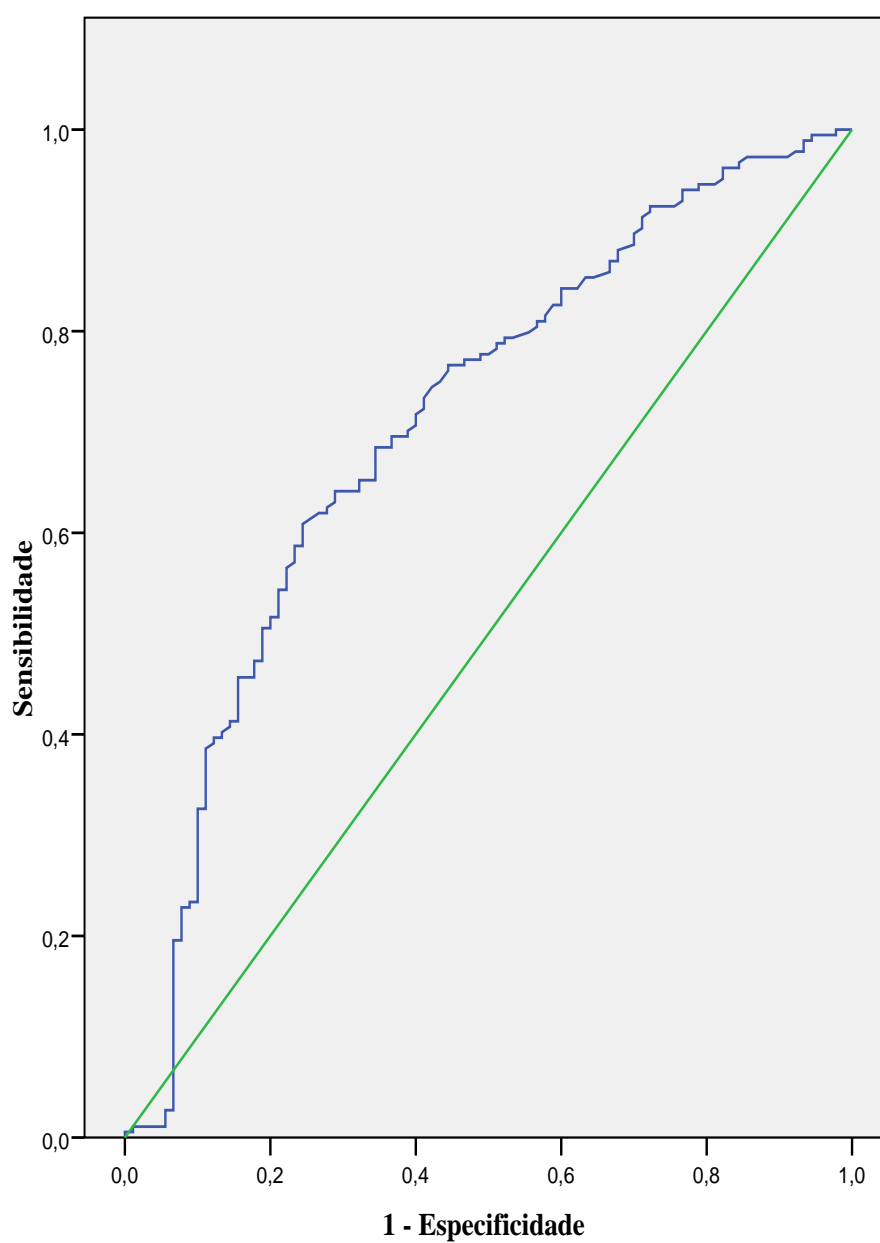


Figura 6. Curva ROC- Dose de células $CD34^+ \times 10^6/Kg$ para a Recuperação de Neutrófilos até décimo - primeiro dia.

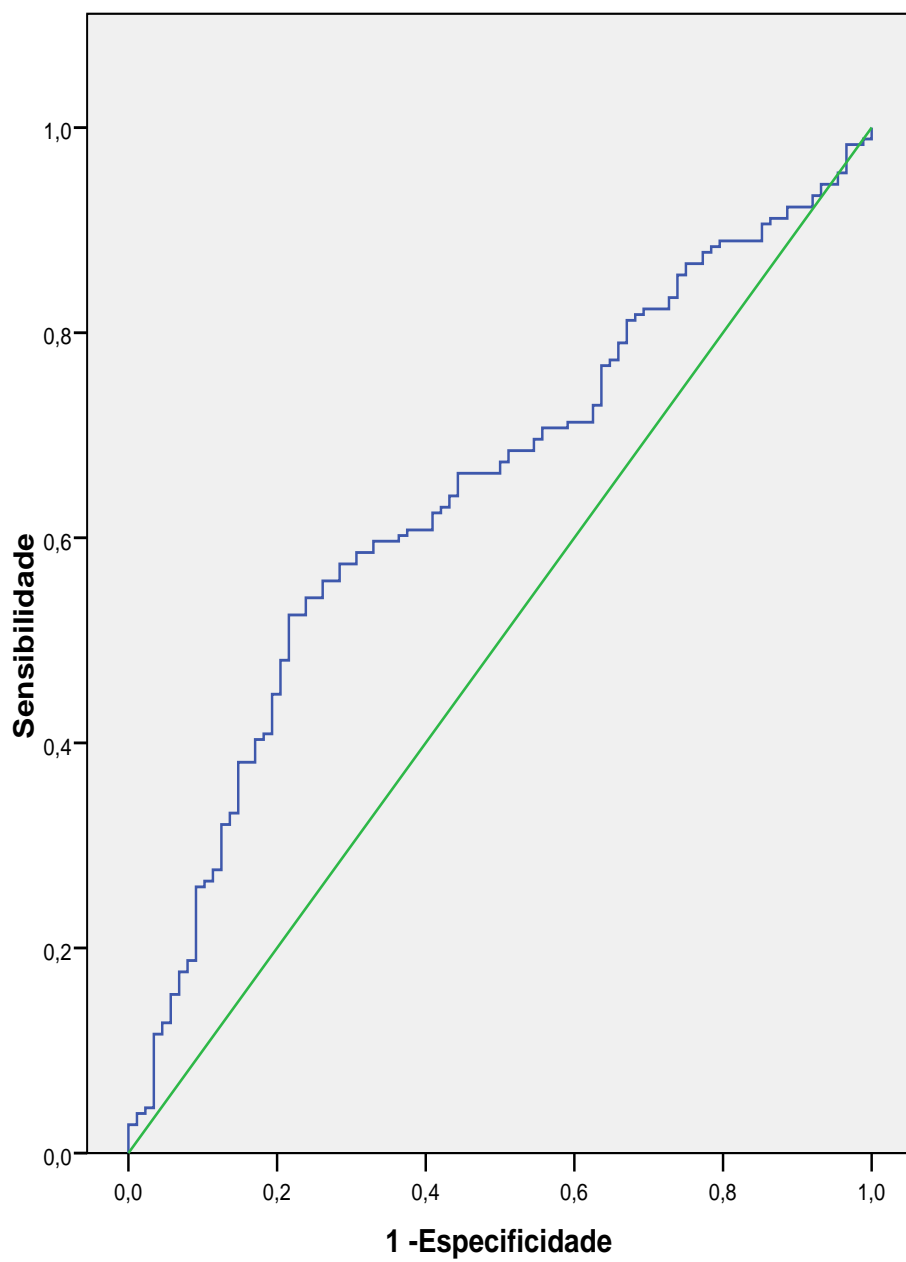


Figura 7. Curva ROC- Dose de células CFU-GMx10⁴/Kg para a Recuperação de Neutrófilos até décimo - primeiro dia.

5.2 Desfechos Hematológicos e Clínicos

A comparação entre os desfechos hematológicos observados nos Grupos A e B estão detalhados nas Tabelas 7 e 8. Seis pacientes foram á óbito, antes de alcançarem a recuperação hematopoética. Choque séptico foi a causa de morte em todos os casos. Quatro pacientes foram á óbito no grupo A. Os casos de mortes no grupo A ocorreram no sétimo, oitavo, décimo-primeiro e décimo-sexto dia. Dois pacientes foram á óbito, no grupo B. Os casos de mortes neste grupo ocorreram no oitavo e nono dia.

Tabela 7. Desfechos hematológicos.

| | Grupo | Mediana | IC | <i>p</i>* |
|---|--------------|----------------|-------------|------------------|
| Duração da neutropenia | A | 7 | 6,52-7,47 | 0,65 |
| | B | 8 | 7,46-8,53 | |
| Tempo para a recuperação dos neutrófilos | A | 11 | 10,77-11,22 | 0,01 |
| | B | 11 | 10,76-11,23 | |
| Tempo para a recuperação das Plaquetas | A | 12 | 11,45-12,54 | 0,73 |
| | B | 12 | 11,67-12,32 | |

IC = Intervalo de Confiança 95%; * Teste de Log rank; Grupo A = 1×10^8 células/mL (173 pacientes); Grupo B 2×10^8 células/mL (102 pacientes).

Tabela 8. Desfechos clínicos.

| | Grupo A | | Grupo B | | p* |
|--|----------------|----------|----------------|----------|-------------|
| | n=173 | % | n=102 | % | |
| Pacientes com febre associada à neutropenia | 172 | 99,4 | 102 | 100 | 1,00 |
| Classificação do episódio febril | | | | | |
| Febre de origem obscura | 80 | 46,2 | 60 | 58,8 | 0,04 |
| Bacteremia | 67 | 38,7 | 31 | 30,4 | 0,15 |
| Microbiologicamente documentada, s/bacteremia | 8 | 4,6 | - | - | 0,02 |
| Clinicamente documentada | 17 | 9,8 | 11 | 10,8 | 0,81 |
| Morte, n(%) | 4† | 2,3 | 2† | 1,96 | 1,00 |

Grupo A (1×10^8 células/mL); Grupo B (2×10^8 células/mL); *Teste Q-Quadrado † choque séptico (Grupo A: D+7, D+8, D+11, D+16; Grupo B: D+8 e D+9).

5.2.1 Tempo para recuperação de neutrófilos

O tempo mediano entre o dia 0 e o primeiro dia com neutrófilos $\geq 500/\mu\text{L}$ é de 11 dias nos dois Grupos, 11 dias (IC 95%, 10,77 a 11,22) no Grupo A e 11 dias (IC 95%, 10,76 a 11,23) no Grupo B ($p = 0,01$), Tabela 7 e Figura 8. Apesar da mediana e do intervalo de confiança da mediana do tempo para a recuperação de neutrófilos serem iguais nos dois grupos, o teste de log-rank apresentou uma diferença estatisticamente significativa. Isto ocorreu, provavelmente, porque este teste não avalia a diferença entre as medianas nos dois grupos analisados e sim a diferença da distribuição dos valores da variável nos dois grupos. Para melhor avaliar o impacto da concentração celular na recuperação de neutrófilos, foram realizadas regressões de Cox e Univariada e Multivariada. Devido à correlação

estatisticamente significativa entre as variáveis células $CD34^+ \times 10^6 / Kg$ infundidas e progenitores $CFU-GM \times 10^4 / Kg$ infundidos ($r = 0,63$, $p = <0,01$, Figura 9), estas variáveis não foram analisadas simultaneamente na Análise de Regressão Multivariada. Apenas as variáveis células $CD34^+ \times 10^6 / Kg$ infundidas e progenitores $CFU-GM \times 10^4 / Kg$ infundidos influenciam o tempo de recuperação de neutrófilos. Os resultados da Análise Regressão de Cox estão descritos na Tabela 9. A Figura 10 apresenta a correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6 / Kg$ infundidas e o tempo para recuperação de neutrófilos ($r = -0,39$, $p < 0,01$).

Recuperação de neutrófilos $\geq 500/\mu\text{L}$

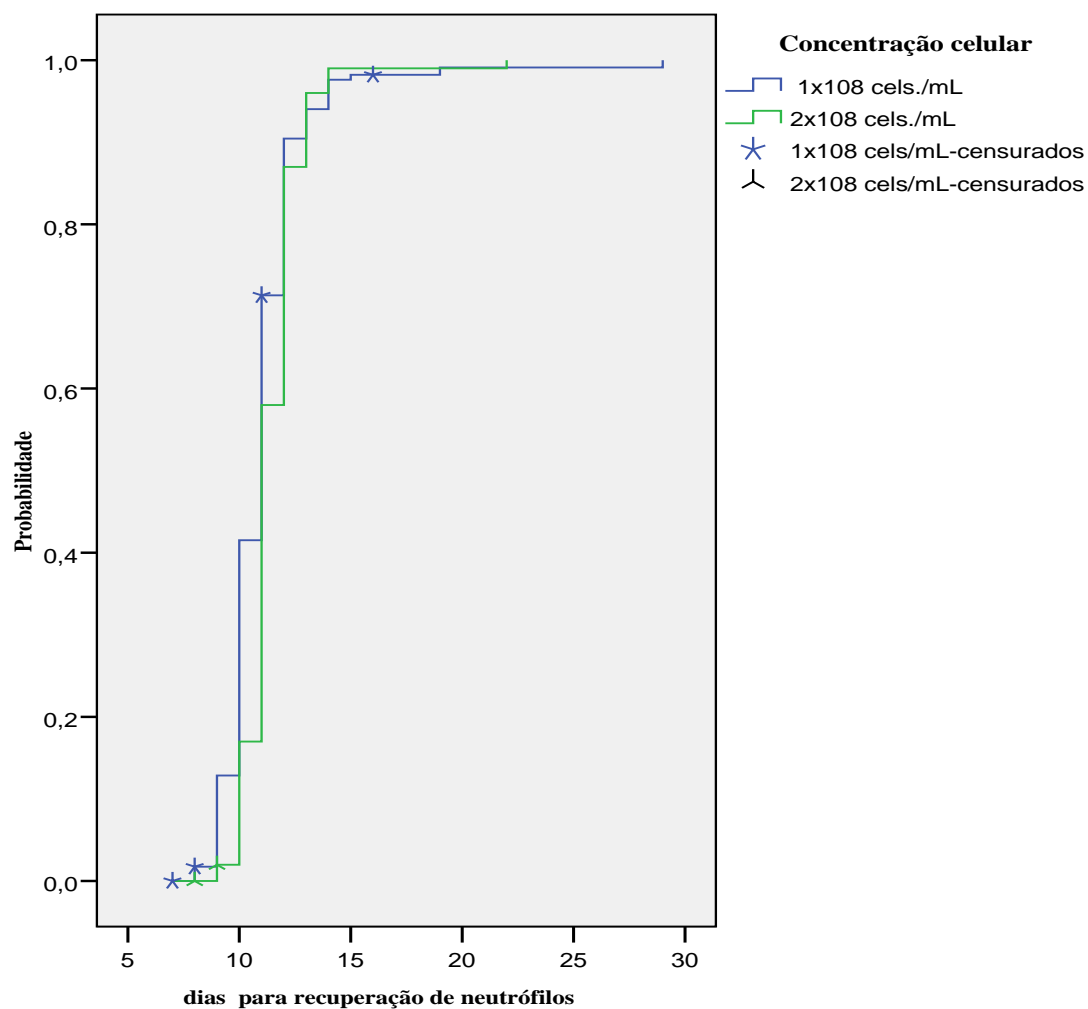


Figura 8. Gráfico das curvas de probabilidade de recuperação de neutrófilos. Concentração 1×10^8 células/ mL = Grupo A; Concentração 2×10^8 células/ mL = Grupo B; $p = 0,01$.

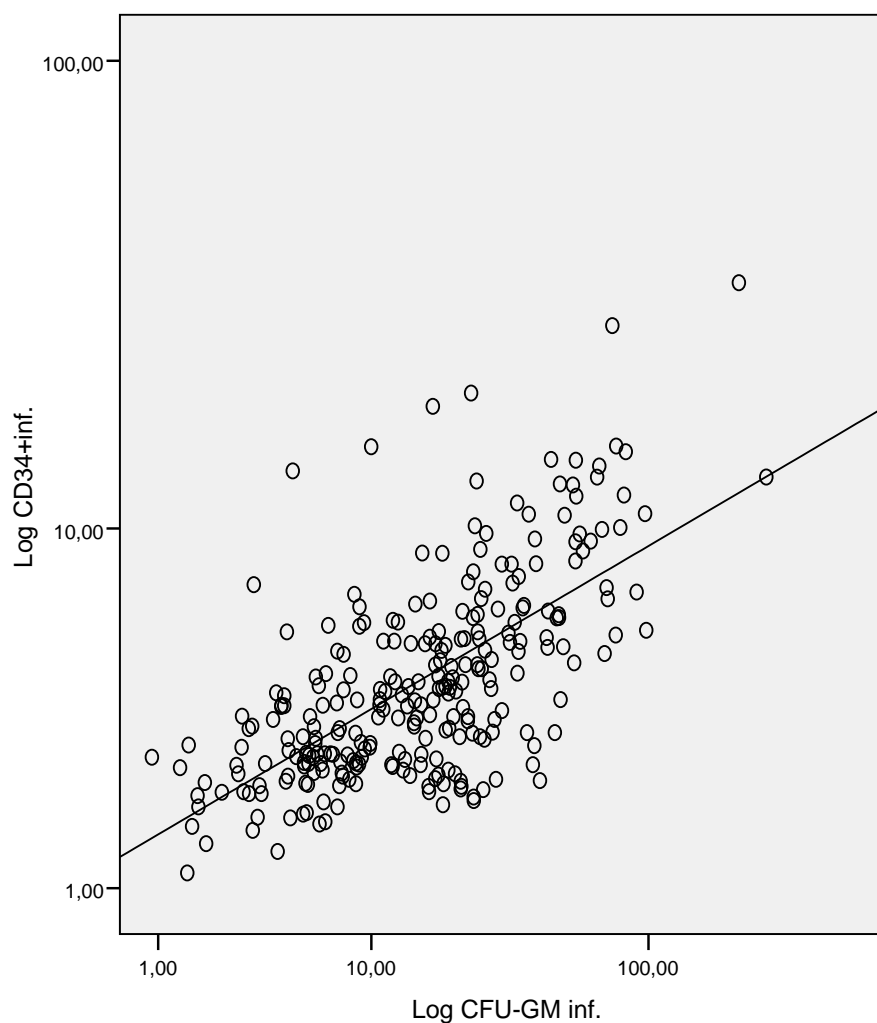


Figura 9. Gráfico da correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6/\text{kg}$ e de $CFU\text{-GM} \times 10^4/\text{kg}$ infundidos. Coeficiente de correlação de Spearman $r = 0,63$, $p < 0,01$.

Tabela 9. Regressão de Cox dos fatores influentes no Tempo para recuperação dos neutrófilos.

| | Univariada | | Multivariada* | | Multivariada† | |
|--|------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|
| | HR | <i>p</i> | HR | <i>p</i> | HR | <i>p</i> |
| Protocolo de Mobilização | | | | | | |
| G-CSF + qt | 1 | | 1 | | 1 | |
| G-CSF | 0,79 | 0,07 | 0,88 | 0,28 | 0,81 | 0,12 |
| Concentração celular | | | | | | |
| 1x10 ⁸ células/mL | 1 | | 1 | | 1 | |
| 2x10 ⁸ 1 células /mL | 0,79 | 0,06 | 0,92 | 0,57 | 0,88 | 0,37 |
| Classificação do episódio febril | | | | | | |
| Febre de origem obscura | 1 | | 1 | | 1 | |
| Febre com infecção | 0,96 | 0,75 | 0,99 | 0,93 | 0,94 | 0,64 |
| CD34⁺ x10⁶/Kg | | | | | | |
| <3x10 ⁶ /Kg | 1 | | 1 | | | |
| ≥3x10 ⁶ /Kg | 1,74 | <0,01 | 1,68 | <0,01 | n.a. | n.a. |
| CFU-GM x10⁴/Kg | | | | | | |
| < 12 x10 ⁴ /Kg | 1 | | | | 1 | |
| ≥ 12 x10 ⁴ /Kg | 1,41 | <0,01 | n.a. | n.a. | 1,39 | <0,01 |

HR (Hazard Ratio) = Razão de Taxa; G-CSF = granulocyte colony-stimulating; qt.= quimioterapia; CFU-GM = Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units; n.a.= não avaliado; *Análise multivariada incluindo a variável CD34⁺x10⁶/Kg e excluindo a variável CFU-GMX10⁴/Kg; †Análise multivariada incluindo a variável CFU-GMX10⁴/Kg e excluindo a variável CD34⁺x10⁶/Kg.

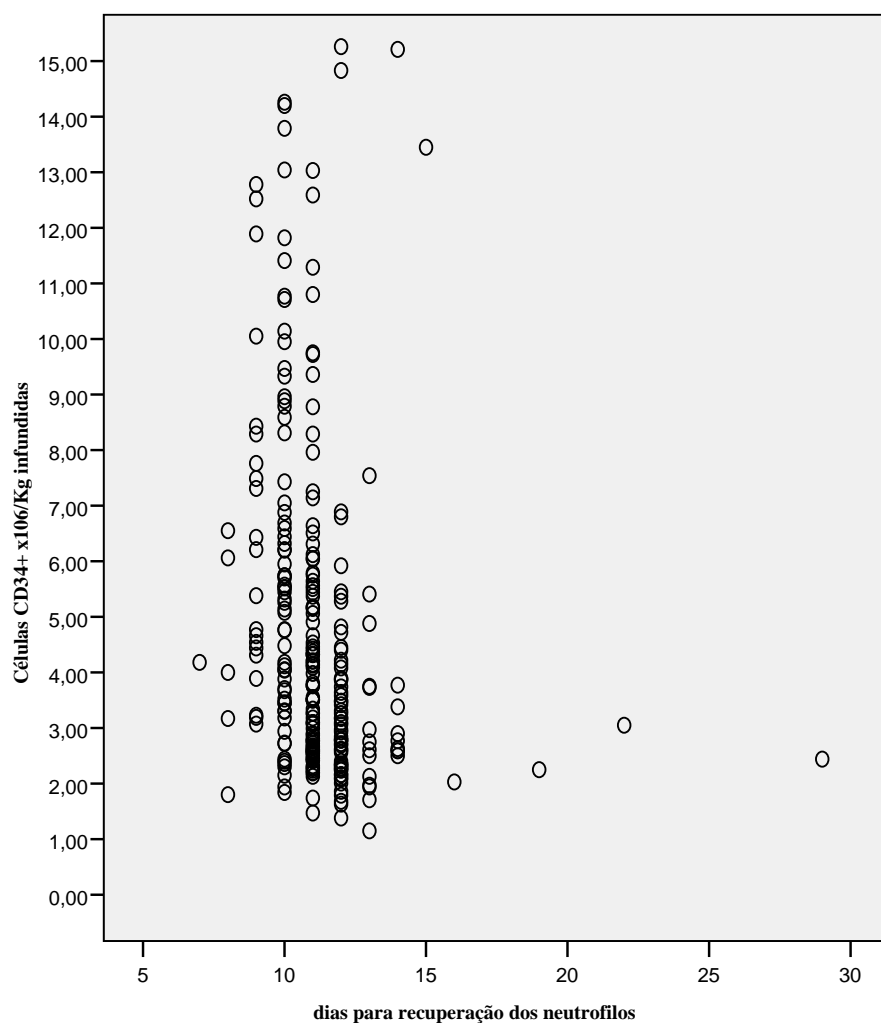


Figura 10. Gráfico da correlação entre a dose de células CD34⁺x10⁶/kg infundido e o tempo para recuperação de neutrófilos. Coeficiente de correlação de Spearman $r = -0,39$ $p < 0,01$.

5.2.2 Tempo para recuperação de Plaquetas

O tempo mediano para recuperação das plaquetas $\geq 20.000/\mu\text{L}$ é de 12 dias (IC 95%, 11,45 a 12,54), no grupo A e de 12 dias (IC 95%, 11,67 a 12,32), no grupo B, não apresentando diferença estatisticamente significativa, Tabela 7 e Figura 11. Para melhor avaliar o impacto da concentração celular na recuperação de plaquetas, foram realizadas regressões de Cox e Univariada e Multivariada. Apenas as variáveis células $\text{CD34}^+ \times 10^6/\text{Kg}$ infundidas e progenitores $\text{CFU-GM} \times 10^4/\text{Kg}$ infundidos influenciam o tempo de recuperação de plaquetas. Devido à correlação estatisticamente significativa entre as variáveis células $\text{CD34}^+ \times 10^6/\text{Kg}$ infundidas e progenitores $\text{CFU-GM} \times 10^4/\text{Kg}$ infundidos ($r=0,63$, $p<0,01$, Figura 9), estas variáveis não foram analisadas simultaneamente na Análise de Regressão Multivariada. Os resultados da Análise Regressão de Cox estão descritos na Tabela 10. A Figura 12 apresenta a correlação entre a dose de células $\text{CD34}^+ \times 10^6/\text{Kg}$ infundidas e o tempo para recuperação de plaquetas ($r = - 0,30$, $p < 0,01$).

Recuperação de plaquetas $\geq 20.000 /\mu\text{L}$

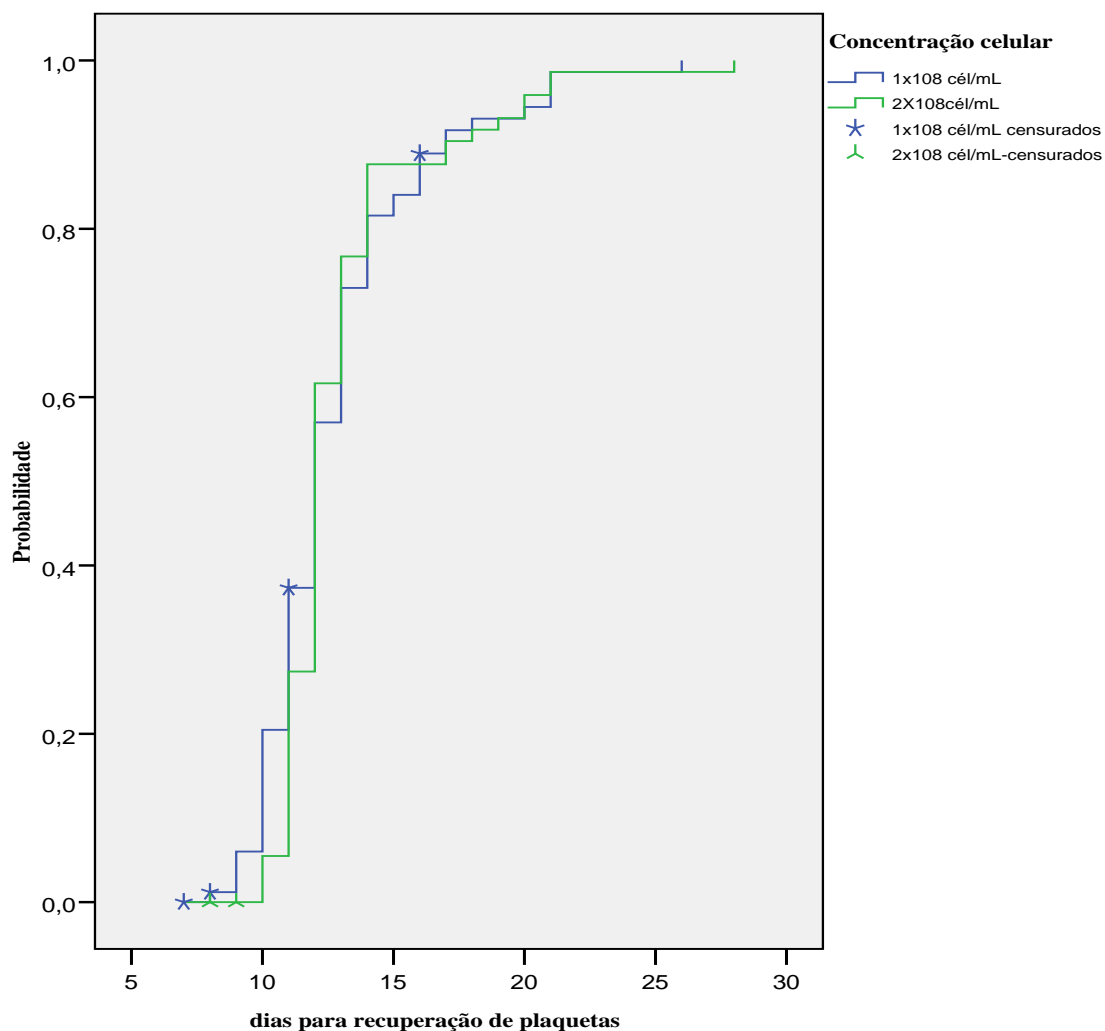


Figura 11. Gráfico das curvas de probabilidade de recuperação de plaquetas
Concentração 1×10^8 células/ mL= Grupo A; Concentração 2×10^8 células/ mL= Grupo B; $p = 0,73$.

Tabela 10. Regressão de Cox dos fatores influentes no Tempo para recuperação de plaquetas.

| | Univariada | | Multivariada* | | Multivariada† | |
|---|------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|-------------|
| | HR | <i>p</i> | HR | <i>p</i> | HR | <i>p</i> |
| Protocolo de Mobilização | | | | | | |
| G-CSF + qt | 1 | | 1 | | 1 | |
| G-CSF | 0,78 | 0,13 | 0,85 | 0,37 | 0,75 | 0,09 |
| Concentração celular | | | | | | |
| 1x10 ⁸ células/mL | 1 | | 1 | | 1 | |
| 2x10 ⁸ 1 células /mL | 0,95 | 0,74 | 1,11 | 0,53 | 1,11 | 0,53 |
| Classificação do episódio febril | | | | | | |
| Febre de origem obscura | 1 | | 1 | | 1 | |
| Febre com infecção | 0,88 | 0,46 | 0,92 | 0,63 | 0,89 | 0,48 |
| CD34 x10⁶/Kg | | | | | | |
| <3x10 ⁶ /Kg | 1 | | 1 | | | |
| ≥3x10 ⁶ /Kg | 1,74 | <0,01 | 1,71 | <0,01 | n.a. | n.a. |
| CFU-GM x10⁴/Kg | | | | | | |
| < 12 x10 ⁴ /Kg | 1 | | | | 1 | |
| ≥12 x10 ⁴ /Kg | 1,50 | 0,02 | n.a. | n.a. | 1,48 | 0,02 |

HR (Hazard Ratio) = Razão de Taxa; G-CSF = granulocyte colony-stimulating; qt.= quimioterapia; CFU-GM = Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units; n.a.= não avaliado; *Análise multivariada incluindo a variável CD34⁺x10⁶/Kg e excluindo a variável CFU-GMX10⁴/Kg; †Análise multivariada incluindo a variável CFU-GMX10⁴/Kg e excluindo a variável CD34⁺x10⁶/Kg.

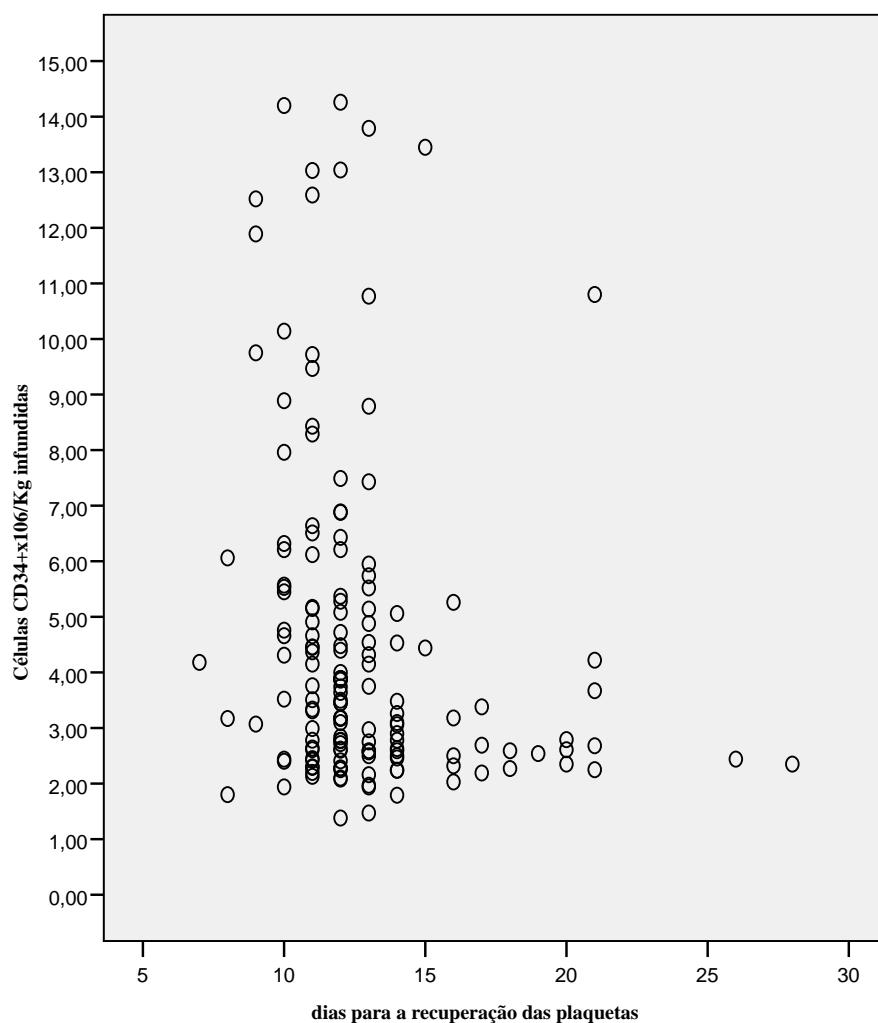


Figura 12. Gráfico da correlação entre a dose de células CD34⁺x10⁶/kg infundido e o tempo para recuperação de plaquetas. Coeficiente de correlação de Spearman $r = -0,30$ $p < 0,01$.

5.2.3 Duração da Neutropenia

A duração mediana da neutropenia é de sete dias (IC 95%, 6,52 a 7,47), no grupo A e de 8 dias (IC 95%, 7,46 a 8,53), no grupo B, não apresentando diferença estatisticamente significativa, Tabela 7 e Figura 13. Para melhor avaliar o impacto da concentração celular na duração da neutropenia, foram realizadas regressões de Cox Univariada e Multivariada. Apenas as variáveis células $CD34^+ \times 10^6/Kg$ infundidas e progenitores $CFU-GM \times 10^4/Kg$ infundidos influenciam a duração da neutropenia. Devido à correlação estatisticamente significativa entre as variáveis células $CD34^+ \times 10^6/Kg$ infundidas e progenitores $CFU-GM \times 10^4/Kg$ infundidos ($r=0,63$, $p=<0,01$, Figura 9), estas variáveis não foram analisadas simultaneamente na Análise de Regressão Multivariada. Os resultados da Análise Regressão de Cox estão descritos na Tabela 11. A Figura 14 apresenta a correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6/Kg$ infundida e a duração da neutropenia. A correlação entre as variáveis células $CD34^+ \times 10^6/Kg$ infundidas, progenitores $CFU-GM \times 10^4/Kg$ infundidos e os desfechos hematológicos estudados é estatisticamente significativa, Tabela 12.

Duração da neutropenia

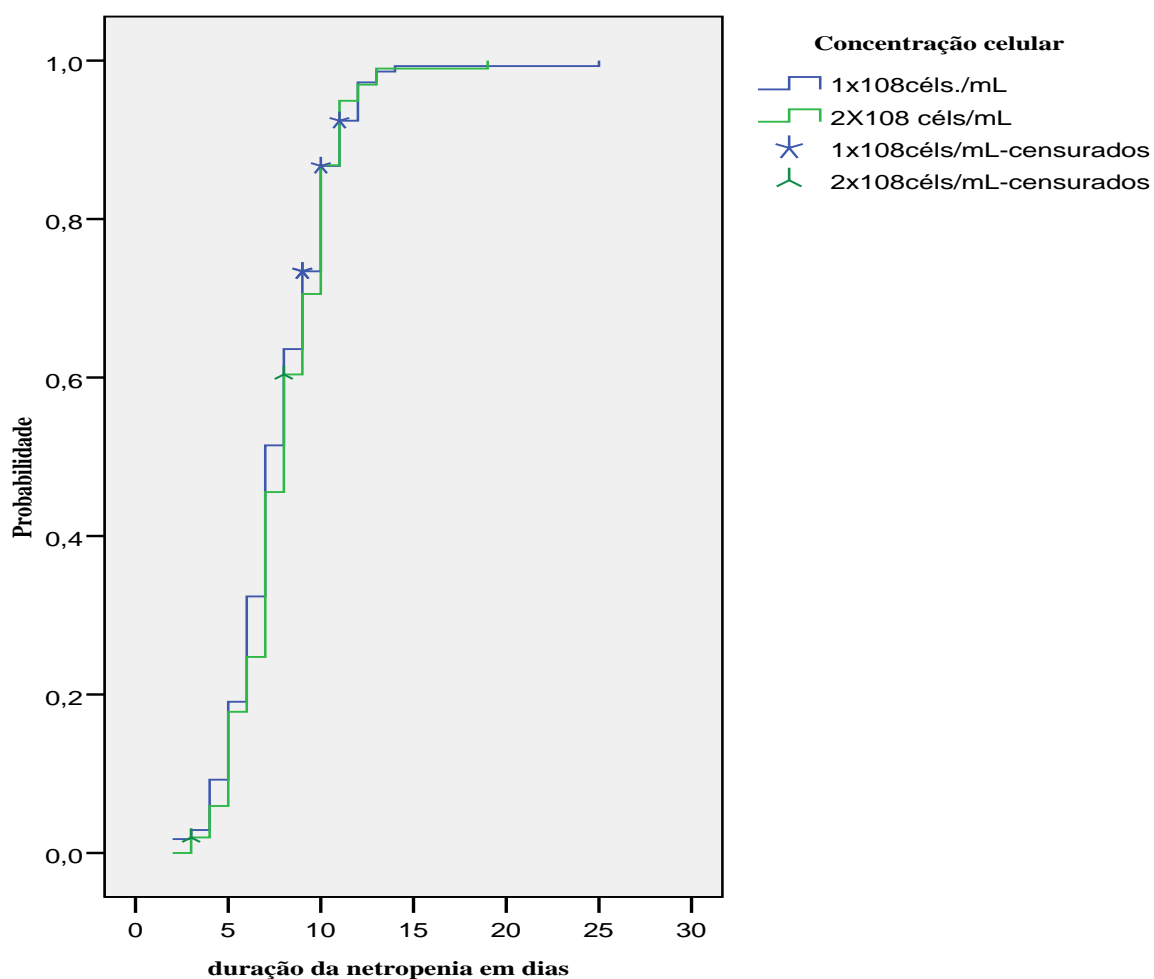


Figura 13. Gráfico das curvas de probabilidade da Duração da neutropenia. Concentração 1×10^8 células/ mL= Grupo A; Concentração 2×10^8 células/ mL= Grupo B; $p = 0,65$.

Tabela 11. Regressão de Cox dos fatores influentes na Duração da Neutropenia.

| | Univariada | | Multivariada* | | Multivariada† | |
|---|------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|
| | HR | <i>p</i> | HR | <i>p</i> | HR | <i>p</i> |
| Protocolo de Mobilização | | | | | | |
| G-CSF + qt | 1 | | 1 | | 1 | |
| G-CSF | 0,93 | 0,58 | 0,96 | 0,76 | 0,90 | 0,44 |
| Concentração celular | | | | | | |
| 1x10 ⁸ células/mL | 1 | | 1 | | 1 | |
| 2x10 ⁸ 1 células /mL | 0,95 | 0,70 | 1,09 | 0,51 | 1,00 | 0,99 |
| Classificação do episódio febril | | | | | | |
| Febre de origem obscura | 1 | | 1 | | 1 | |
| Febre com infecção | 0,80 | 0,07 | 0,87 | 0,27 | 0,79 | 0,06 |
| CD34 x10⁶/Kg | | | | | | |
| <3x10 ⁶ /Kg | 1 | | 1 | | | |
| ≥3x10 ⁶ /Kg | 1,91 | <0,01 | 1,91 | <0,01 | n.a. | n.a |
| CFU-GM x10⁴/Kg | | | | | | |
| < 12 x10 ⁴ /Kg | 1 | | | | 1 | |
| ≥ 12 x10 ⁴ /Kg | 1,41 | <0,01 | n.a. | n.a | 1,43 | 0,01 |

HR (Hazard Ratio) = Razão de Taxa; G-CSF = granulocyte colony-stimulating; qt.= quimioterapia; CFU-GM = Granulócitos e Macrófago-Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units; n.a.= não avaliado *Análise multivariada incluindo a variável CD34⁺x10⁶/Kg e excluindo a variável CFU-GMX10⁴/Kg; †Análise multivariada incluindo a variável CFU-GMX10⁴/Kg e excluindo a variável CD34⁺x10⁶/Kg.

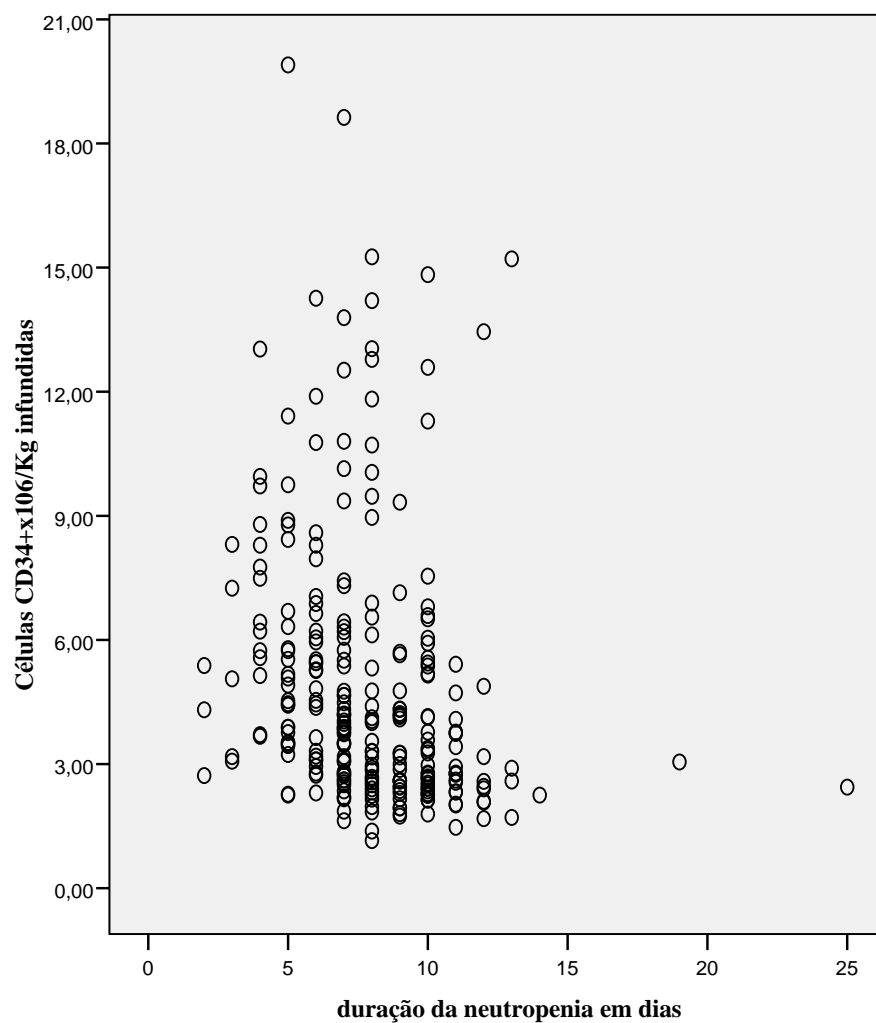


Figura 14. Gráfico da correlação entre a dose de células $CD34^+ \times 10^6/kg$ infundido e a duração da neutropenia. Coeficiente de correlação de Spearman $r = -0,37$ $p < 0,01$.

Tabela 12. Análise de Correlação de Spearman's entre as variáveis células CD34⁺ x10⁶/Kg e CFU-GM x10⁴/Kg infundidos e as variáveis de tempo para recuperação hematológica.

| Variáveis | CD34 ⁺ x10 ⁶ /Kg | | CFU-GMx10 ⁴ /Kg | |
|--|--|-------|----------------------------|-------|
| | r | p | r | p |
| Tempo para recuperação dos neutrófilos ≥ 5000/μL | -0,39 | <0,01 | -0,29 | <0,01 |
| Tempo para recuperação das plaquetas ≥ 20x10 ⁹ /L | -0,30 | <0,01 | -0,24 | <0,01 |
| Duração da neutropenia | -0,37 | <0,01 | -0,24 | <0,01 |

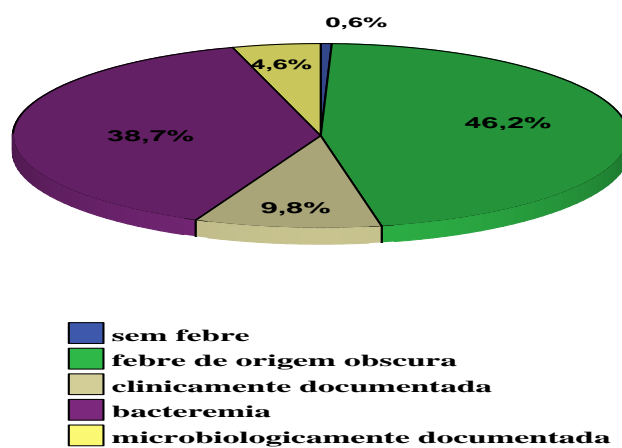
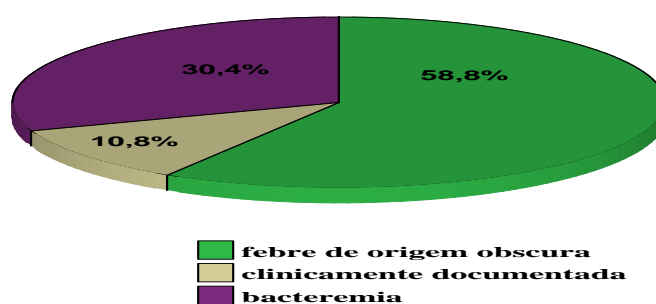
CFU-GM = Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units

5.2.4 Febre associada à neutropenia

Febre associada à neutropenia ocorreu em 99,4% dos pacientes do Grupo A e em 100% dos pacientes do Grupo B (p=1,00), Tabela 8.

5.2.5 Classificação do episódio febril

Documentação microbiológica ou clínica de infecção, incluindo os casos de bacteremia, ocorreu em 92 (53,1%) dos pacientes que tiveram febre associada à neutropenia no Grupo A, e em 42 (41,2%), no Grupo B (p=0,05). O episódio de neutropenia febril classificado como febre de origem obscura, ocorreu em 80 (46,4%) pacientes do Grupo A, e em 60 (58,8%) dos pacientes do Grupo B (p= 0,04). Bacteremia ocorreu em 67 (38,7%) dos pacientes do Grupo A e em 31 (30,4%) dos pacientes do Grupo B (p= 0,15). A classificação e a distribuição do episódio de neutropenia febril estão descritas na Tabela 8 e Figura 15.

Grupo A**Grupo B****Figura 15.** Gráfico da Classificação do episódio de neutropenia febril.

Grupo A (1×10^8 células/mL) composto de 173 pacientes, 172 casos de febre com neutropenia febril (febre de origem obscura 80, clinicamente documentada 17, bacteremia 67, microbiologicamente documentada 8). Grupo B (2×10^8 células/mL) composto de 102 pacientes, 102 casos de febre com neutropenia febril (febre de origem obscura 60, clinicamente documentada 11, bacteremia 31).

5.2.6 Mortalidade

A mortalidade geral do estudo é de 2,2%. Quatro pacientes (2,3%) foram a óbito no Grupo A e dois pacientes (1,96%) foram a óbito no Grupo B ($p=1,00$). O choque séptico foi a causa de óbito em todos os casos, Tabela 8.

Influência da concentração celular na recuperação da viabilidade e dos progenitores CFU-GM.

5.3 Características dos Produtos de leucaféreses

Foram analisados 419 produtos de leucaféreses referentes aos 275 pacientes estudados. Duzentos e oitenta produtos foram criopreservados com concentração celular 1×10^8 células/mL (protocolo A) e cento e trinta e nove com concentração celular 2×10^8 células/mL (protocolo B), Tabela 13.

A mediana do percentual de células vivas antes da criopreservação é maior no protocolo A (100 e 99,4 $p < 0,01$). Esta pequena diferença pode ser consequência do maior número de bolsas que foram refrigeradas entre as bolsas criopreservadas com o protocolo B em relação ao protocolo A. mediana da proporção de mononucleares e do número de células $CD34^+$ é maior nas bolsas criopreservadas com o protocolo B (78 e 85; $p < 0,01$ e 168,4 e 205,2 e; $p < 0,01$), Tabela 13. A mediana do volume das bolsas criopreservadas é 1,25 vezes maior no protocolo A. A mediana do percentual de células viáveis e a recuperação da viabilidade dos produtos criopreservados com os protocolos A e B não apresentam diferenças estatisticamente significativas, a mediana do CFU-GM $\times 10^4$ (252,08 e 372,67, $< 0,01$) e da recuperação do CFU-GM $\times 10^4$ (41,2 e 57,3; $p < 0,01$) é maior no protocolo B, Tabela 14.

O cálculo dos gastos, em reais, com a criopreservação dos produtos de leucaféreses nos dos dois protocolos estudados (A e B) e a economia gerada com a utilização do protocolo

B estão demonstrado na Tabela 15. O protocolo B promove a economia de R\$ 162,28 (Cento e sessenta e dois reais e vinte e oito centavos), Tabela 15.

Tabela 13. Variáveis dos produtos de leucaféreses antes da criopreservação.

| | Protocolo | Média | DP | Mediana | Min.-Máx. | <i>p</i> * |
|-------------------------------|-----------|--------|--------|---------|-------------|-----------------|
| CNx10⁸ | A | 360,7 | 202,6 | 309,6 | 8,7-1049,1 | <0,01 |
| | B | 515,8 | 216,4 | 480 | 150-1527,2 | |
| Vial. % | A | 99,5 | 1,10 | 100 | 90,5-100,0 | <0,01 |
| | B | 98,9 | 1,43 | 99,4 | 88,7- 100,0 | |
| MNC % | A | 74,5 | 15,6 | 78 | 11-9 | <0,01 |
| | B | 80 | 16,9 | 85 | 21-100 | |
| CD34 x10⁶ | A | 274,9 | 334,4 | 168,4 | 5,8-3577,5 | 0,04 |
| | B | 370,6 | 555,7 | 205,2 | 1,1-4689,9 | |
| CFU-GM x10⁴ | A | 1342,8 | 2272,6 | 668,7 | 2,7-21635,7 | 0,24 |
| | B | 1365 | 2453,3 | 672 | 22,2-23752 | |

DP = Desvio Padrão; Min. = mínimo; Máx. = Máximo; *Mann Whitney test; CN = Células Nucleadas; Viab. = Viabilidade; MNC=Células Mononucleares; Recup. = Recuperação; CFU-GM = Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units; Protocolo A= 1×10^8 células./mL (280 leucaféreses); Protocolo B = 2×10^8 células/mL (139 leucaféreses)

Tabela 14. Variáveis dos produtos de leucaféreses após a criopreservação.

| | Protocolo | Média | DP | Mediana | Min.-Máx. | p* |
|--------------------------------|------------------|--------------|-----------|----------------|------------------|-----------------|
| N° de bolsas | A | 5,0 | 2,6 | 4,0 | 1-20 | <0,01 |
| | B | 3,7 | 1,6 | 4,0 | 1-11 | |
| Vol. das bolsas/aférese | A | 348,8 | 190 | 300 | 60-975 | <0,01 |
| | B | 259,8 | 107,6 | 240 | 75-745 | |
| Viab. % | A | 86,4 | 8,2 | 87,6 | 59-100 | 0,53 |
| | B | 85,3 | 8,8 | 87,3 | 47,1- 98,6 | |
| CFU-GM x10⁴ | A | 596,9 | 1097,3 | 252,0 | 1,5-11572,9 | <0,01 |
| | B | 869,4 | 1503,1 | 372,6 | 14,1-12260 | |
| Recup. da viabilidade | A | 86,9 | 8,2 | 88,1 | 59,1- 100 | 0,92 |
| | B | 86,5 | 8,8 | 87,9 | 47,5-100 | |
| Recup. do CFU-GM | A | 45,9 | 32,0 | 41,2 | 1,2- 254,5 | <0,01 |
| | B | 66,7 | 44,0 | 57,3 | 4,0-229,4 | <0,01 |

DP = Desvio Padrão; Min. = minimum; Máx. = Máximo; *teste de Mann Whitney; CN = células nucleadas; Viab.= viabilidade; MNC= células mononucleares; Recup.= Recuperação; CFU-GM = Granulócitos e Macrófago-Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units; Protocolo A = 1×10^8 células./mL (280 leucaféreses); Protocolo B = 2×10^8 células/mL (139 leucaféreses).

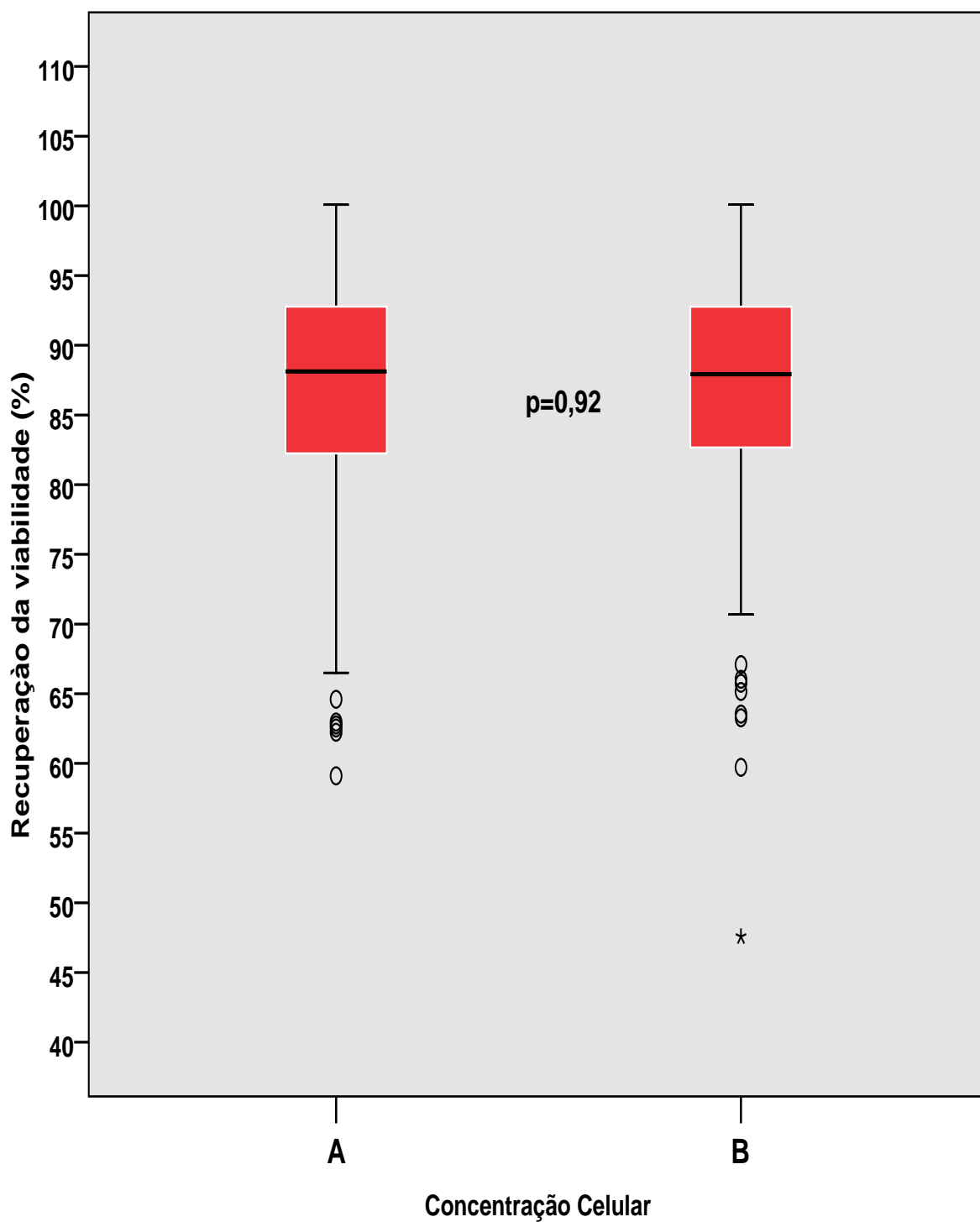


Figura 16- Comparação da recuperação da viabilidade celular em produtos de leucaféreses após a criopreservação. Protocolo A= 1×10^8 células./mL e Protocolo B= 2×10^8 células./mL, teste de Mann Whitney $p=0,92$.

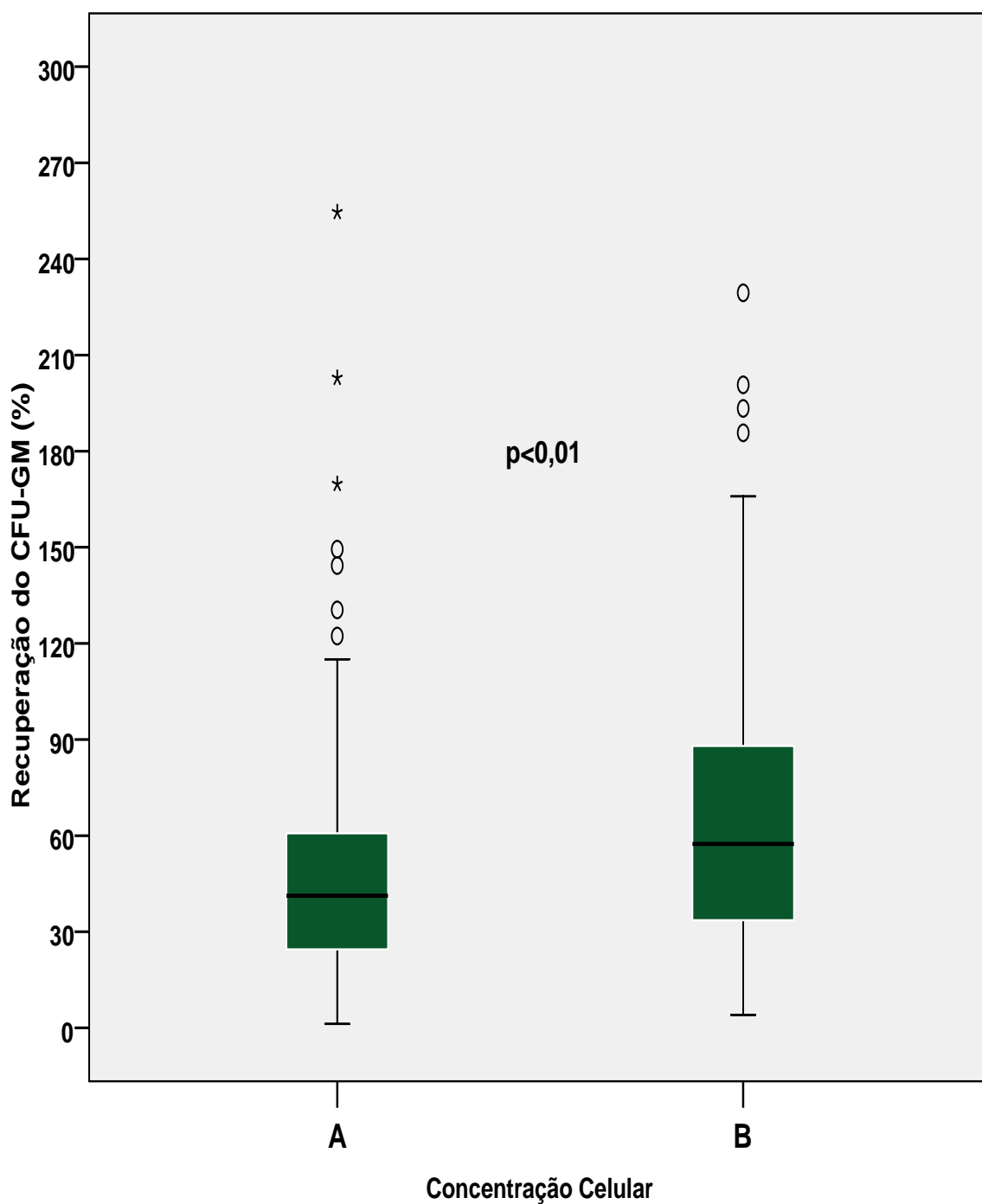


Figura 17- Comparação da recuperação dos progenitores CFU-GM em produtos de leucaféreses após a criopreservação. Protocolo A= 1×10^8 células./mL e Protocolo B= 2×10^8 células./mL, teste de Mann Whitney $p < 0,01$.

Tabela 15. Cálculo da economia do processo de criopreservação comparando os dois protocolos.

| | DMSO | Meio de Cultura | Bolsa de Congelamento | Total |
|--|-------------|------------------------|------------------------------|--------------|
| Preço em reais (R\$) | 5,5/mL | 0,15/mL | 108/unid. | - |
| Consumo médio do protocolo A | 34,8mL | 139,5 mL | 5 unids. | - |
| Consumo médio do protocolo B | 25,9 mL | 103,9 mL | 3,7 unids. | - |
| Gastos com protocolo A, em reais (R\$) | 191,8 | 20,9 | 540 | 752,7 |
| Gastos com protocolo B, em reais (R\$) | 142,8 | 15,6 | 432 | 590,4 |

DMSO = Dimetilsulfóxido; unids.=unidades; Protocolo A= 1×10^8 células/mL; Protocolo B = 2×10^8 células/mL

6 DISCUSSÃO

A concentração celular ideal a ser utilizada nos protocolos de criopreservação de CTHs permanece indefinida. A justificativa desta indefinição deve-se ao fato do limitado número de estudos sobre este assunto. A concentração celular ideal poderia se definida como a concentração celular máxima que não causaria prejuízos à recuperação celular, após o descongelamento, nem a recuperação hematopoética, nos pacientes transplantados.

Apesar da falta de padronização nos protocolos de criopreservação de CTHs, a concentração celular da até 2×10^8 células/mL é utilizada por diversos Centros de Transplante do Mundo (WINDRUM *et al.* 2005; BAKER, 2006). Esta concentração também foi adotada pelo Laboratório de Cultura e Criopreservação de Medula Óssea/ Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho- HUCFF. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as mudanças do protocolo de criopreservação de CTHs, ocorridas neste Centro de Transplante, no que diz respeito às diferentes concentrações adotadas.

O maior número de pacientes (275 pacientes) avaliados e a consideração das variáveis clínicas, como fatores potencialmente influentes para a recuperação hematopoética dos pacientes transplantados, tornaram este estudo mais completo em relação aos estudos de Perseghin *et al.* e Kawano *et al.*, que também estudaram os efeitos da concentração celular até a concentração de 2×10^8 células/mL (PERSEGHIN *et at.* 1997; KAWANO *et al.*, 2004).

A avaliação da variável concentração celular de forma categórica, em dois protocolos (1×10^8 e 2×10^8 células/mL), e a exclusão de pacientes que receberam infusão com produtos nas duas concentrações, contribuíram para a precisão e confiabilidade dos resultados analisados por este estudo. Por outro lado, nos estudos de Rowley *et al.*, Cabezudo *et al.* e Martin-Henao *et al.*, a concentração celular foi categorizada em dois grupos com grande variação entre os valores mínimos e máximos em relação à mediana (ROWLEY *et al.*, 1994;

CABEZUDO *et al.* 2000 MARTIN-HENAO *et al.*, 2005). Nestes estudos, a recuperação da viabilidade ou dos progenitores foi menor nos protocolos com concentração celular mais alta, porém as medianas dos tempos para a recuperação hematopoética dos pacientes, que receberam produtos criopreservados nos dois protocolos, não foram estatisticamente diferentes (ROWLEY *et al.*, 1994; CABEZUDO *et al.* 2000 e MARTIN-HENAO *et al.*, 2005). No entanto, é necessário salientar que Cabezudo *et al.* e Martin-Henao *et al.* não mencionam o controle do transplante com produtos criopreservados em uma única concentração estudada.

Além das variáveis clínicas estudadas pelo grupo de Martin-Henao *et al.*, o presente trabalho avaliou outras variáveis consideradas relevantes aos desfechos analisados. Assim, o número de ciclos quimioterápicos e os diferentes regimes administrados antes da terapia com transplante autólogo, o regime de condicionamento, a doença de base, a idade, o sexo, o protocolo de mobilização de CTHs empregado, o dia que se iniciou o G-CSF, o número de células CD34 infundidas, o número de progenitores CFU-GM infundidos, foram considerados neste estudo.

Tricot *et al.* demonstram a importância da análise da intensidade dos regimes quimioterápicos ao correlacionar os fatores preditores para recuperação hematopoética após transplante autólogo em pacientes com diagnóstico de Mieloma Múltiplo (TRICOT *et al.*, 1995). Gandhi *et al.* relataram o efeito do número de ciclos de quimioterapia, prévia ao transplante, como fator influente para recuperação de pacientes após transplante autólogo (GANDHI *et al.*, 1999). Embora os estudos sobre o efeito da administração de quimioterapia prévia na recuperação hematopoética apresentem resultados controversos, a consideração desta variável foi inevitável para avaliação dos desfechos propostos neste estudo (DRAKE *et al.*, 1997; MARTÍN *et al.* 2005).

O benefício do uso precoce ou tardio do G-CSF, após o transplante, para a velocidade

de recuperação hematopoética tem sido investigado em diversos estudos (DE AZEVEDO *et al.* 2002; THOMPSON *et al.* 2009).

A possibilidade de atraso no tempo para recuperação hematopoética em decorrência de infecção microbiológica após o transplante também foi considerado como fator importante para análise dos resultados.

A escolha das variáveis estudadas também foi baseada no estudo de Olivieri *et al.* que analisou os fatores que afetam a recuperação hematopoética após transplante autólogo (OLIVIERI *et al.*, 1998). É certo que a determinação dos fatores preditores para a recuperação celular e hematopoética não é objetivo deste estudo, porém a consideração destes fatores foi relevante para a elaboração do mesmo.

Em relação à análise dos resultados, para a avaliação de desfechos do tipo “tempo-para-um-evento”, que podem incluir casos censurados (pacientes que foram á óbito sem atingir a recuperação), recomenda-se o uso de métodos de análise de sobrevivência (CHAN, 2004b). O método de Kaplan-Meier foi usado neste estudo. Em relação aos demais estudos que avaliaram o efeito da concentração celular criopreservada na recuperação hematopoética, apenas Rowley *et al.* e Martín-Henao *et al.* utilizaram este procedimento. Os demais autores utilizaram os testes de Mann-Whitney para compararem a mediana dos tempos para recuperação hematológica (PERSEGHIN *et al.* 1997; KAWANO *et al.*, 2004; ROWLEY *et al.*, 1994; CABEZUDO *et al.* 2000 e MARTIN-HENAO *et al.*, 2005).

Na comparação dos dois grupos de pacientes estudados (grupo A e B), observou-se que as variáveis protocolo de mobilização, quantidade de células CD34⁺ infundidas, quantidade de progenitores CFU-GM infundido e classificação do episódio febril encontravam-se distribuídas de forma diferente entre os dois grupos. Estas diferenças foram estatisticamente significantes e foram consequentes das mudanças de protocolo transcorridas no HUCFF, no período de tempo avaliado no estudo. Assim como, a adoção mais recente do

protocolo de criopreservação B (maior concentração), a mobilização com G-CSF tem sido mais empregada, justificando a maior proporção de pacientes que utilizaram este protocolo de mobilização no Grupo B. No tratamento do Mieloma Múltiplo, a realização de leucaférese para dois transplantes teve adoção mais recente. Trinta e cinco pacientes, que participaram deste estudo, tiveram os produtos de leucaféreses destinados para a realização de dois transplantes. Desta forma, apesar da mediana da quantidade de células CD34⁺ colhidas ser maior nas bolsas criopreservadas no protocolo B, a necessidade de distribuição do produto final criopreservado para dois transplantes justifica a mediana da dose de CD34⁺ infundida ser menor no Grupo B.

Em relação aos desfechos clínicos, o uso de antibioticoterapia com ciprofloxacina iniciou no ano 2006 e parece ser responsável pela menor proporção de casos de neutropenia febril com documentação bacteriológica no período de recuperação hematopoética após o transplante (BUCANEVE *et al.*, 2005; GAFTER-GVILI *et al.*, 2005). A mediana do tempo para recuperação de neutrófilos $\geq 500/\mu\text{L}$ é maior nos pacientes do Grupo B, os quais receberam produtos criopreservados com a maior concentração estudada (protocolo B ou 2×10^8 células/mL). As medianas do tempo para recuperação das plaquetas e de duração da neutropenia não são estatisticamente diferentes nos dois grupos estudados (A e B).

Para avaliar o impacto da concentração celular e das demais variáveis, com distribuição diferente nos dois grupos, na recuperação hematopoética e na duração da neutropenia foram realizadas Análises Univariadas e Multivariadas do tipo Regressão de Cox. Apenas as variáveis CD34⁺ $\times 10^6/\text{Kg}$ e CFU-GM $\times 10^4/\text{Kg}$ infundidos influenciaram no tempo para recuperação hematopoética.

O número de células CD34⁺ infundidas é, atualmente, aceito como o melhor parâmetro para se avaliar a probabilidade e prever a velocidade da recuperação dos neutrófilos e plaquetas (PÉREZ-SIMÓN *et al.*, 1999). Apesar de não haver consenso sobre a dose ideal, a

faixa de $5-8 \text{ CD34}^+ \times 10^6/\text{Kg}$ tem sido recomendada (OLIVIERI *et al.*, 1998; JILLELLA & USTUN, 2004). Doses abaixo de $2,5 \times 10^6 \text{ CD34}^+/\text{Kg}$ são consideradas inadequadas e associadas à maior risco de falência do enxerto, porém a dose acima da qual não haveria benefícios adicionais permanece em discussão (JILLELLA & USTUN, 2004). Nos resultados deste estudo, observa-se a correlação direta entre a concentração de células CD34^+ infundidas e os desfechos hematológicos estudados (recuperação de neutrófilos, recuperação de plaquetas e duração da neutropenia). A importância desta variável como fator preditor para recuperação hematopoética e duração da neutropenia foi também demonstrada nas análises multivariadas realizadas. A dose acima de 3×10^6 células CD34^+ apresentou-se como fator preditor bom para a recuperação hematológica. No entanto, a seleção dos pacientes para este estudo limita a definição da dose de células CD34^+ preditora, para a recuperação hematopoética, no transplante autólogo.

A importância da concentração de progenitores CFU-GM infundido ($\text{CFU-GM} \times 10^4/\text{Kg}$), como fator preditor para recuperação hematopoética, tem sido discutida e por vezes pouco aceita (YANG *et al.*, 2005; JANSEN *et al.*, 2007). Isto se deve a grande variabilidade nos protocolos de ensaio de cultura, adotados pelos diversos Centros de Transplante (BURGER *et al.* 1999), e aos diferentes métodos de análise estatística empregado para avaliação dos resultados.

Jansen *et al.* apresentaram a mesma correlação entre a dose de CFU-GM e CD34^+ infundido deste estudo ($r = 0,63$, $p < 0,001$). No entanto, os autores analisaram as duas variáveis em um único modelo de Regressão Multivariada, concluindo que apenas a dose de células CD34^+ tem valor preditivo para a recuperação hematopoética (JANSEN *et al.*, 2007). Neste estudo, considerou-se a correlação destas duas variáveis bem como a interdependência das mesmas. Desta forma, a adoção de apenas um único modelo de regressão é inadequada (CHAN, 2004a). A análise em modelos separados das duas variáveis demonstra a importância

das mesmas na recuperação hematopoética e na duração da neutropenia. Bender *et al.* relataram a dose de 20×10^4 CFU-GM/Kg e 2×10^6 CD34⁺/Kg como fatores preditores para a rápida recuperação hematopoética após o transplante com CTHs mobilizadas para o SP (BENDER *et al.*, 1992). A importância desta variável como fator preditor para recuperação hematopoética e duração da neutropenia foi também demonstrada nas análises multivariadas realizadas neste estudo. A dose acima de 12×10^4 progenitores CFU-GM apresentou-se como fator preditor bom para a recuperação hematológica. No entanto, a seleção dos pacientes para este estudo limita a definição da dose de progenitores CFU-GM preditora, para a recuperação hematopoética, no transplante autólogo.

Na análise dos 419 produtos de leucaféreses, não se observou prejuízo na recuperação da viabilidade e dos progenitores CFU-GM. A recuperação dos progenitores CFU-GM é maior no grupo B, possivelmente, devido à redução da citotoxicidade promovida pela maior proporção de células em relação ao volume de DMSO. A grande variabilidade nos resultados da recuperação dos progenitores CFU-GM entre os pacientes dos dois protocolos foi observada. A razão para esta variabilidade permanece desconhecida. Um estudo mais abrangente considerando a quimioterapia e radioterapia prévia ao transplante, bem como, variáveis clínicas faz-se necessário para a avaliação destes resultados.

A prevalência de pacientes que apresentaram sintomas adversos durante a reinfusão não foi observado neste estudo. No entanto, a mediana do volume de DMSO infundido foi 40% menor no grupo B. Certamente, a redução do volume de DMSO infundido diminuiu o risco de reações tóxicas relativa a este crioprotetor.

A utilização do protocolo B promoveu em média a redução do custo do procedimento até R\$ 162,30/leucaférese. Para esta base de cálculo foram utilizados os preços licitados, pela Administração do HUCFF, do agente crioprotetor DMSO, do meio de cultura RPMI e das

bolsas de congelamento, que foram os materiais que tiveram maior redução com a utilização do protocolo B.

7 CONCLUSÕES

A criopreservação das Células-Tronco Hematopoéticas, mobilizadas para o sangue periférico, com concentração celular de $2,0 \times 10^8$ células/mL diminui o custo do procedimento de criopreservação, sem prejudicar a recuperação da viabilidade, a recuperação dos progenitores CFU-GM e recuperação hematopoética, quando comparada com o congelamento com concentração celular de 1×10^8 células/mL.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSEN, J.F.; BAKKEN, A.M.; BRUSERUD, Ø. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. **Transfusion**, v.42, n.12, p.1573-1580, Dec. 2002.

ADAMS, G. B.; SCADDEN, D. T. The hematopoietic stem cell in its place. **Nature Immunology**, v. 7, n.4, p.333-337, Apr. 2006.

AKKÖK, C. A.; LISETH, K.; NESTHUS, I.; LØKELAND, T.; TEFRE, K.; BRUSERUD, O.; ABRAHAMSEN, J. F. Autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved with 5 and 10 percent dimethyl sulfoxide alone give comparable hematopoietic reconstitution after transplantation. **Transfusion**, v.48, n. 5, p. 877-883, May. 2008.

AKKÖK, C.A.; HOLTE, M. R.; TANGEN, J. M.; OSTENSTAD, B.; BRUSERUD, O. Hematopoietic engraftment of dimethyl sulfoxide-depleted autologous peripheral blood progenitor cells. **Transfusion** v.49, n. 2, p. 354-361, Oct. 2009.

ALESSANDRINO, P.; BERNASCONI, P.; CALDERA, D.; COLOMBO, A.; BONFICHI, M.; MALCOVATI, L.; KLERSY, C.; MARTINELLI, G.; MAIOCCHI, M.; PAGNUCCO, G.; VARETONI, M.; PEROTTI, C.; BERNASCONI, C. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. **Bone Marrow Transplantation**, v.23, n.6, p.533-537, Mar. 1999.

ARSLAN, O.; MOOG, R. Mobilization of peripheral blood stem cells. **Transfusion Apheresis Science**, v.37, n.2, p. 179-185, Oct. 2007.

ASSOU, S, CERECEDO, D.; TONDEUR, S.; PANTESCO, V.; HOVATTA, O.; KLEIN, B.; HAMAMAH, S.; DE VOS, J. A gene expression signature shared by human mature oocytes and embryonic stem cells. **BMC Genomics**, v.10, n.10, p. 1-15, Jan. 2009.

ATTAL, M.; HAROUSSEAU, J. L. Role of autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. **Best Practice Research Clinical Haematology**, v.20, n.4, p. 747-759, Dec. 2007.

BAJADA, S.; MAZAKOVA, I.; RICHARDSON, J. B.; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 4, p.169 – 183, Jun. 2008.

BAKKEN, A. M. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. **Current Stem Cell Research Therapy**, v. 1, n.1, p. 47-54, Jan. 2006.

BAUM, C. M.; WEISSMAN, I. L.; TSUKAMOTO, A. S.; BUCKLE, A. M.; PEULT, B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. **Proceedings National Academy of Science of the United States of America**, v.89, n.7, p.2804-2808, Apr.1992.

BENDER, J. G.; TO, L. B.; WILLIAMS, S.; SCHWARTZBERG, L. S. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *Journal of Hematotherapy*, v. 4, n.1, p.329-341, Winter.1992.

BENDER, J. G.; UNVERZAGT, K.; WALKER, D. E.; LEE, W.; SMITH, S.; WILLIAMS, S.; VAN EPPS, D. E. Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.70, n.1, p. 10-18, Jan. 1994.

BENEKLI, M.; ANDERSON, B.; WENTLING, D.; BERNSTEIN, S.; CZUCZMAN, M.; MCCARTHY, P. Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. **Bone Marrow Transplantation**. v.25, n.12, p. 1299-1301, Jun. 2000.

BERZ, D.; MCCORMACK, E. M.; WINER, E. S.; COLVIN, G. A.; QUESENBERRY, P. J. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. **American Journal of Hematology**, v.82, n.6, p. 463-472, Jun. 2007.

BISWAS, A.; HUTCHINS, R. Embryonic stem cells. **Stem Cells Development**, v.16, n.2, p. 213-222, Apr. 2007.

BROXMEYER, H. E.; DOUGLAS, G. W.; HANGOC, G.; COOPER, S.; BAR, D. J.; ENGLISH, D.; ARNY, M.; THOMAS, L.; BOYSE, E. A. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the the United States of America**, v.86, n, 10, p. 3828-3832, May. 1989.

BROXMEYER, H. E.; SROUR, E. F.; HANGOC, G.; COOPER, S.; ANDERSON, S. A.; BODINE, D. M. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. **Proceedings National Academy of Science of the United States of America**, v.100, n.2, p. 645-650, Jan. 2003.

BUCANEVE, G.; MICOZZI, A.; MENICHETTI, F.; MARTINO, P.; DIONISI, M. S.; MARTINELLI, G.; ALLIONE, B.; D'ANTONIO, D.; BUELLI, M.; NOSARI, A. M.; CILLONI, D.; ZUFFA, E.; CANTAFFA, R.; SPECCHIA, G.; AMADORI, S.; FABBIANO, F.; DELILIERIS, G. L.; LAURIA, F.; FOÀ, R.; DEL FAVERO, A.; GRUPPO ITALIANO MALATTIE EMATOLOGICHE DELL'ADULTO (GIMEMA) INFECTION PROGRAM. Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. **The New England Journal of Medicine**, v.353, n.10, p.977-987, Sep. 2005.

BURGER, S. R.; KADIDLO, D.; MCCULLOUGH, J. Improved progenitor assay standardization using peripheral blood progenitor cells from a donor treated with granulocyte-colony-stimulating factor. **Transfusion**, v.39, n.5, p.451-456, May. 1999.

CABEZUDO, E.; DALMASES, C.; RUZ, M.; SANCHEZ, J. A.; TORRICO, C.; SOLA, C.; QUEROL, S.; GARCÍA, J. Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function. **Transfusion**, v.40 n.10, p. 1223-1227, Oct. 2000.

CHAN, Y. H. Biostatistics 201: Linear Regression Analysis. **Singapore Medical Journal**, v.45, n.2, p.55-61, Feb. 2004a.

CHAN, Y. H. Biostatistics 203. Survival analysis. **Singapore Medical Journal**, v.45, n.6, p.249-256, Jun. 2004b.

CHESHER, S. H.; MORRISON, S. J.; LIAO, X.; WEISSMAN, I. L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. **Proceedings National Academy of Science of the United States of America**, v.96, n.6, p. 3120-3125, Mar. 1999.

COLVIN, G. A.; LAMBERT, J. F.; ABEDI, M.; DOONER, M. S.; DEMERS, D.; MOORE, B. E.; GREER, D.; ALIOTTA, J. M.; PIMENTEL, J.; CERNY, J.; LUM, L. G.; QUESENBERRY, P. J. Differentiation hotspots: the deterioration of hierarchy and stochasm. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 32, n.1, p. 34-41, Jan-Feb. 2004.

COVAS, D. T. A Identificação das Células-Tronco. In: **Células-Tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2007. p.87-92.

CUMANO, A.; GODIN, I. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. **Current Opinion Immunology**, v.13; n.2, p.166-171, Apr. 2001.

CURCOY, A. I.; ALCORTA, I.; ESTELLA, J.; RIVES, S.; TOLL, T.; TUSET, E. Cryopreservation of HPCs with high cell concentration in 5-percent DMSO for transplantation to children. **Transfusion**, v.42, n.7, p.962, Jul. 2002.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n.11, p.2204-2213, Jun. 2006.

DE AZEVEDO, A. M.; NUCCI, M.; MAIOLINO, A.; VIGORITO, A. C.; SIMÕES, B. P.; ARANHA, F. J.; TABAK, D. G.; VOLTARELLI, J.; DE SOUZA, C. A. A randomized, multicenter study of G-CSF starting on day +1 vs. day +5 after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v.29, n.9, p. 745-751, May. 2002.

DEMIRER, T.; BENSINGER, W. I.; BUCKNER, C. D.; Peripheral blood stem cell mobilization for high-dose chemotherapy, **Journal Hematotherapy**, v. 8, n.2, p. 103-113, Apr. 1999.

DEVETTEN, M.; ARMITAGE, J. O. Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. **Annals of Oncology**, v. 18, n.9, p. 1450-1456, Sep. 2007.

DONNENBERG, A. D.; KOCH, E. K.; GRIFFIN, D. L.; STANCZAK, H. M.; KISS, J. E.; CARLOS, T. M.; BUCHBARKER, D. M.; YEAGER, A. M. Viability of cryopreserved BM progenitor cells stored for more than a decade. **Cytotherapy**, v.4, n.2, p. 157-163, 2002.

DRAKE, M.; RANAGHAN, L.; MORRIS, T. C.; NOLAN, L.; DESAI, Z. R.; IRVINE, A. E.; JORDAN, A.; MAGILL, K.; PRICE, S. Analysis of the effect of prior therapy on progenitor cell yield: use of a chemotherapy scoring system. **British Journal of Haematology**, v. 98, n.3, p.745-749, Sep. 1997.

FEUGIER, P.; BENSOUSSAN, D.; GIRARD, F.; ALLA, F.; SCHUHMACHER, A.; LATGER-CANNARD, V.; HULIN, C.; WITZ, F.; WITZ, B.; CARRET, A. S.; BORDIGONI, P.; LEDERLIN, P.; JANOT, C. Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of postthaw CD34+ cells. **Transfusion**, v. 43, n.7, p. 878-884, Jul. 2003.

FIETZ, T.; REUFI, B.; MÜCKE, C.; THIEL, E.; KNAUF, W. U. Flow cytometric CD34+ determination in stem cell transplantation: before or after cryopreservation of grafts?. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v.11, n.2, p. 429-435, Apr. 2002.

FOYGEL, K.; CHOI, B.; JUN, S.; LEONG, D. E.; LEE, A.; WONG, C. C.; ZUO, E.; ECKART, M.; REIJO PERA, R. A.; WONG, W. H.; YAO, M. W. A novel and critical role for Oct4 as a regulator of the maternal-embryonic transition. **PLoS ONE**, v.3.n.12, 2008.

From the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR). Diseases Treatable by Hematopoietic Cell Transplant. Disponível no site: <http://www.marlow.org/PHYSICIAN/Tx_Indications_Timing_Referral/Diseases_Treatable_by_HCT/index.html>. Acesso em: 10 de maio.2009

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v.116, n.6, p. 769-778, Mar. 2004.

GAFTER-GVILI, A.; FRASER, A.; PAUL, M.; LEIBOVICI, L. Meta-analysis: antibiotic prophylaxis reduces mortality in neutropenic patients. **Annals Internal Medicine**, v.142, n.12, p.979-995, Jun. 2005.

GALMÉS, A.; BESALDUCH, J.; BARGAY, J.; NOVO, A.; MOREY, M.; GUERRA, J. M.; DURAN, M. A. Long-term storage at -80 degrees C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. **Transfusion**, v.39, n. 1, p. 70-73, Jan. 1999.

GANDHI, M. K.; JESTICE, K.; SCOTT, M. A.; BLOXHAM, D.; BASS, G.; MARCUS, R. E. The minimum CD34 threshold depends on prior chemotherapy in autologous peripheral blood stem cell recipients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 23, n.1, p.9-13, Jan. 1999.

GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H. A.; AUERBACH, A. D.; FRIEDMAN, H. S.; DOUGLAS, G. W.; DEVERGIE, A.; ESPEROU, H.; THIERRY, D.; SOCIE, G.; LEHN, P. *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **The New England journal of medicine**, v.321, n.17, p. 1174-1178, Oct. 1989.

GLUCKMAN, E.; ROCHA, V. Cord blood transplantation: state of the art. **Haematologica**, v.94, n.4, p. 451-454, Apr. 2009.

GODIN, I.; CUMANO, A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. **Nature reviews. Immunology**, v.2, n.8, p. 593-604, Aug. 2002.

GOTHOT, A.; VAN DER LOO, J. C.; CLAPP, D. W.; SROUR, E. F. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. **Blood**, v.92, n.8, p. 2641-2649, Oct. 1998.

GRATAMA, J. W.; ORFAO, A.; BARNETT, D.; BRANDO, B.; HUBER, A.; JANOSSY, G.; JOHNSEN, H. E.; KEENEY, M.; MARTI, G. E.; PREIJERS, F.; ROTHE, G.; SERKE, S.; SUTHERLAND, D. R.; VAN DER SCHOOT, C. E.; SCHMITZ, G.; PAPA, S. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. **Cytometry**, v.34, n.3, p. 128-142, Jun. 1998.

HAHN, T.; WINGARD, J. R.; ANDERSON, K. C.; BENSINGER, W. I.; BERENSON, J.R.; BROZEIT, G.; CARVER, J. R.; KYLE, R. A.; MCCARTHY, P. L. The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of multiple myeloma: an evidence-based review. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.9, n.1, p. 4-37, Jan. 2003.

HALLE, P.; TOURNILHAC, O.; KNOPINSKA-POSLUSZNY, W.; KANOLD, J.; GEMBARA, P.; BOIRET, N.; RAPATEL, C.; BERGER, M.; TRAVADE, P.; ANGIELSKI, S.; BONHOMME, J.; DEMÉOCQ, F. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. **Transfusion**, v. 41, n.5, p. 667-673, May. 2001.

HAYLOCK, D. N.; NILSSON, S. K. Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation. **Current stem cell research & therapy**, v.2, n.4, p. 324-335, Dec. 2007.

HOHAUS, S.; MARTIN, H.; WASSMANN, B.; EGERER, G.; HAUS, U.; FÄRBER, L.; BURGER, K. J.; GOLDSCHMIDT, H.; HOELZER, D.; HAAS, R. Recombinant human granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (G-CSF and GM-CSF) administered following cytotoxic chemotherapy have a similar ability to mobilize peripheral blood stem cells. **Bone Marrow Transplantation**, v.22, n.7, p. 625-630, Oct. 1998.

HOŁOWIECKI, J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v.118, n.11, p. 658-663, Nov. 2008.

IANNALFI, A.; BAMBI, F.; TINTORI, V.; LACITIGNOLA, L.; BERNINI, G.; MARIANI, M. P.; SANVITO, M. C.; PAGLIAI, F.; BRANDIGI, F.; MUSCARELLA, E.; TAPINASSI, F.; FAULKNER, L. Peripheral blood progenitor uncontrolled-rate freezing: a single pediatric center experience. **Transfusion**, v.47, n.12, p. 2202-2206, Dec. 2007.

JACOBSON, L. O.; MARKS, E. K.; *et al.* The role of the spleen in radiation injury. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.70, n.4, p. 740-742, Apr. 1949.

JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MAJKA, M.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M. Z. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. **Stem Cells**, v.19, n.2 p. 99-107, 2001.

JANSEN, E. M.; HANKS, S. G.; TERRY, C.; AKARD, L. P.; THOMPSON, J. M.; DUGAN, M. J.; JANSEN, J. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit-granulocyte-macrophage, or both? **Transfusion**, v.47, n.5, p.817-823, May.2007.

JANSEN, J.; THOMPSON, J. M.; DUGAN, M. J.; NOLAN, P.; WIEMANN, M. C.; BIRHIRAY, R.; HENSLEE-DOWNEY, P. J.; AKARD, L. P. Peripheral blood progenitor cell transplantation. **Therapeutic Apheresis**, v.6, n.1, p. 5-14, Feb. 2002.

JANSEN, J.; HANKS, S.; THOMPSON, J. M.; DUGAN, M. J.; AKARD, L. P. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9, n.1, p. 37-50, Jan-Mar. 2005.

JILLELLA, A. P.; USTUN, C. What is the optimum number of CD34+ peripheral blood stem cells for an autologous transplant? **Stem Cells Development**, v.13, n.6, p.598-606, Dec. 2004.

KAUFMAN, D. S.; HANSON, E. T.; LEWIS, R. L.; AUERBACH, R.; THOMSON, J. A. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.19, p. 10716-10721, Sep. 2001.

KAWANO, Y.; LEE, C. L.; WATANABE, T.; ABE, T.; SUZUYA, H.; OKAMOTO, Y.; MAKIMOTO, A.; NAKAGAWA, R.; WATANABE, H.; TAKAUE, Y. Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer. **Annals Hematology**, v.83, n.1, p. 50-54, Jan. 2004.

KELLER, G. M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v.7, n.6, p. 862-869, Dec. 1995.

KESSINGER, A.; ARMITAGE, J. O. The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. **Blood**, v. 77, n.2, p. 211-213, Jan. 1991.

KIEL, M. J.; YILMAZ, O. H.; IWASHITA, T.; YILMAZ, O. H.; TERHORST, C.; MORRISON, S. J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. **Cell**, v. 121, n.7, p. 1109-1121, Jul. 2005.

KIRSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL, L. R. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions -National Institutes of Health-USA. 2001. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter5.asp>>. Acesso em: 25 mar. 2009.

KOBYLKA, P.; IVANYI, P.; BREUR-VRIESENDORP, B. S. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. **Transplantation**, v.65, n.9, p. 1275-1278, May. 1998.

KRÖGER, N.; KRÜGER, W.; RENGES, H.; ZELLER, W.; RAUHÖFT, C.; LÖLIGER, C.; ZANDER, A. R. Comparison of progenitor cell collection on day 4 or day 5 after steady-state stimulation with G-CSF alone in breast cancer patients: influence on CD34+ cell yield, subpopulation, and breast cancer cell contamination. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v.9, n.1, p. 111-117, Feb. 2000.

KROSHINSKY, F.; HÖLIG, K.; EHNINGER, G. The role of pegfilgrastim in mobilization of hematopoietic stem cells. **Transfusion and Apheresis Science**. v.38, n.3, p. 237-244, Jun. 2008.

LEE, H. S.; CRANE, G. G.; MEROK, J. R.; TUNSTEAD, J. R.; HATCH, N. L.; PANCHALINGAM, K.; POWERS, M. J.; GRIFFITH, L. G.; SHERLEY, J. L. Clonal expansion of adult rat hepatic stem cell lines by suppression of asymmetric cell kinetics (SACK). **Biotechnology and Bioengineering**, v.83, n.7, p. 760-771, Sep. 2003.

LEIBO, S. P.; MAZUR, P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. **Cryobiology**, v.8, n.5, p. 447-452, Oct. 1971.

LEMISCHKA, I. R.; RAULET, D. H.; MULLIGAN, R. C. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. **Cell**, v.45, n.6, p. 917-927, Jun. 1986.

LORENZ, E.; UPHOFF, D.; REID, T. R.; SHELTON, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. **Journal of the National Cancer Institute**, v.12, n.1, p. 197-201, Aug. 1951.

LOVELOCK JE, BISHOP MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. **Nature**, v.183, n.4672, p. 1394-1395, May. 1959.

LUCIDARME, N.; VALTEAU-COUANET, D.; OBERLIN, O.; COUANET, D.; KALIFA, C.; BEAUJEAN, F.; LAPIERRE, V.; HARTMANN, O. Phase II study of high-dose thiotepa and hematopoietic stem cell transplantation in children with solid tumors. **Bone Marrow Transplantation**, v.22, n.6, p. 535-540, Sep. 1998.

LUMELSKY, N.; BLONDEL, O.; LAENG, P.; VELASCO, I.; RAVIN, R.; MCKAY, R. . Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. **Science**, v.292, p. 1389-1394, May. 2001.

MARSHMAN, E.; BOOTH, C.; POTTEN, C. S. The intestinal epithelial stem cell. **Bioessays**, v.24, n.1, p. 91-98, Jan. 2002.

MARTÍN A, PÉREZ-SIMÓN JA, CABALLERO MD, LÓPEZ-HOLGADO N, VÁZQUEZ L, DEL CAÑIZO MC, SAN MIGUEL JF. Effect of pre-transplant cumulative doses of chemotherapeutic drugs on early and long-term hematological recovery after autologous bone-marrow transplantation for lymphoma. **Haematologica**, v.90, n.1, p.78-85, Jan. 2005.

MARTIN-HENAO, G. A.; TORRICO, C.; AZQUETA, C.; AMILL, B.; QUEROL, S.; GARCIA, J. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells from apheresis at high cell concentrations does not impair the hematopoietic recovery after transplantation. **Transfusion**, v.45, n.12, p. 1917-1924, Dec. 2005.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American journal of physiology**, v.247, p. C125-42, Sep. 1984.

MCDONALD, J. W; LIU, X. Z; QU, Y; LIU, S.; MICKEY. S. K.; TURETSKY, D.; GOTTLIEB, D. I.; CHOI, D. W. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. **Nature Medicine**, v.5, n.12, p. 1410-1412, Dec. 1999.

MEHTA, J.; SINGHAL, S. Current status of autologous hematopoietic stem cell transplantation in myeloma. **Bone Marrow Transplantation**, v.42. suppl. 1, p. S28-S34, Aug. 2008.

MENDRONE, A. JR.; ARRAIS, C.A.; SABOYA, R.; CHAMONE, D. A; DULLEY, F. L. Factors affecting hematopoietic progenitor cell mobilization: an analysis of 307 patients. **Transfusion and Apheresis Science**, v.39, n.3, p. 187-192, Dec. 2008.

MERYMAN, H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice. **Transfusion**, v.47, n.5, p.935-945, May. 2007.

METCALF, D. In-vitro cloning techniques for hemopoietic cells: clinical applications. **Annals of Internal Medicine**, v.87, n.7, p. 483-488, Oct .1977.

MINTZ, B.; ANTHONY, K.; LITWIN, S. Monoclonal derivation of mouse myeloid and lymphoid lineages from totipotent hematopoietic stem cells experimentally engrafted in fetal hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, n.24, p. 7835-7839, Dec. 1984.

MOOG, R. Apheresis techniques for collection of peripheral blood progenitor cells. **Transfusion and Apheresis Science**, v.31, n.3, p.207-220, Dec. 2004.

MORRISON, S. J.; UCHIDA, N.; WEISSMAN, I. L. The biology of hematopoietic stem cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.11, p. 35-71, 1995.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell**, v.88, n.3, p.287-298, Feb. 1997.

MORRISON, S. J.; SPRADLING, A. C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. **Cell**, v.132, n.4, p.598-611, Feb. 2008.

NERVI, B.; LINK, D. C.; DIPERSIO, J. F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.99, n.3, p. 690-705, Oct. 2006.

NOROL, F.; SCOTTO, F.; DUEDARI, N.; BEAUJEAN, F. Peripheral blood stem cell collection with a blood cell separator. **Transfusion**, v.33, n.11, p. 894-897, Nov-Dec. 1993.

NUCCI, M.; SPECTOR, N.; BUENO, A. P.; SOLZA, C.; PERECMANIS, T.; BACHA, P. C.; PULCHERI, W. Risk factors and attributable mortality associated with superinfections in neutropenic patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v.24, n.4, p.575-579, Apr. 1997.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. J.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARTINS, C. A.; TRABASSO, P.; SOLZA, C.; MANGINI, C.; SIMÕES, B. P.; COLOMBO, A. L.; VAZ, .; LEVY, C. E.; COSTA, S.; MOREIRA, V. A.; OLIVEIRA, J. S.; PARAGUAY, N.; DUBOC, G.; VOLTARELLI, J. C.; MAIOLINO, A.; PASQUINI, R.; SOUZA, C. A. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and Fusarium infection. **Cancer**, v.98, n.2, p. 315-319, Jul. 2003.

OLIVIERI, A.; OFFIDANI, M.; MONTANARI, M.; CINIERO, L.; CANTORI, I.; OMBROSI, L.; MASIA, C. M.; CENTURIONI, R.; MANCINI, S.; BRUNORI, M.; LEONI, P. Factors affecting hemopoietic recovery after high-dose therapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a single center experience. **Haematologica**, v.83, n.4, p.329-337, Apr. 1998.

PAMPHILON, D. Stem-cell harvesting and manipulation. **Vox Sanguinis**, v.87, Suppl1, p. 20-25, Jul. 2004.

PASSEGUÉ, E.; JAMIESON, C. H.; AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, Suppl 1, p. 11842-11849, Sep. 2003.

PEGG, D. E. The preservation of tissues for transplantation. **Cell Tissue Bank**, v.7, n.4, p. 349-358, 2006.

PEREZ-OTEYZA, J.; BORNSTEIN, R.; CORRAL, M.; HERMOSA, V.; ALEGRE, A.; TORRABADELLA, M.; RAMOS, P.; GARCIA, J.; ODRIÓZOLA, J.; NAVARRO, J. L. Controlled-rate versus uncontrolled-rate cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: a prospective multicenter study. Group for Cryobiology and Biology of Bone Marrow Transplantation (CBTMO), Spain. **Haematologica**, v.83, n.11, p. 1001-1005, Nov. 1998.

PÉREZ-SIMÓN, J. A.; MARTÍN, A.; CABALLERO, D.; CORRAL, M.; NIETO, M. J.; GONZALEZ, M.; VAZQUEZ, L.; LÓPEZ-BERGES, C.; CAÑIZO, M. C.; MATEOS, M. V.; ORFAO, A.; SAN MIGUEL, J. F. Clinical significance of CD34+ cell dose in long-term engraftment following autologous peripheral blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v.24, n.12, p.1279-1283, Dec. 1999.

PERRY, A. R.; LINCH, D. C. The history of bone-marrow transplantation. **Blood Reviews**, v.10, n.4, p. 215-219, Dec. 1996.

PERSEGHIN, P.; EPIS, R.; VIGANO, M.; MALACRIDA, A.; PASTORINI, A.; CAMERONE, G. Satisfactory recovery and viability of stem cells cryopreserved at high cell concentration. **Transfusion Science**, v.18, n.3, p. 399-403, Sep. 1997.

PIKE, B. L.; ROBINSON, W. A. Human bone marrow colony growth in agar-gel. **Journal of Cellular Physiology**, v.76, n.1, p.77-84, Aug. 1970.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p. 143-147, Apr. 1999.

QUESENBERRY, P. J.; COLVIN, G. A.; LAMBERT, J. F. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. **Blood**, v.100, n.13, p.4266-4271, Dec. 2002.

RIFÓN, J. J. Transplant of hemopoietic progenitors. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v.29, Suppl 2, p. 137-151, 2006.

RÖLLIG, C.; BABATZ, J.; WAGNER, I.; MAIWALD, A.; SCHWARZE, V.; EHNINGER, G.; BORNHÄUSER, M. Thawing of cryopreserved mobilized peripheral blood--comparison between waterbath and dry warming device. **Cytotherapy**, v.4, n.6, p. 551-555, 2002.

ROWLEY, S.D.; BENSINGER, W. I.; GOOLEY, T. A.; BUCKNER, C. D. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. **Blood**, v.83, n.9, p. 2731-2736, May. 1994.

SIENA, S.; BREGNI, M.; BRANDO, B.; RAVAGNANI, F.; BONADONNA, G.; GIANNI, A. M. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor **Blood**, v.74,n. 6, p. 1905-1914, Nov 1989.

SAUER-HEILBORN, A.; KADIDLO, D.; MCCULLOUGH, J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. **Transfusion**, v.44, n.6, p. 907-916, Jun. 2004.

SHERLEY, J. L. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. **Stem Cells**, v.20, n.6, p. 561-72, 2002.

SPECCHIA, G.; PASTORE, D.; MESTICE, A.; LISO, A.; CARLUCCIO, P.; LEO, M.; CASANOVA, M.; SIBILLA, S.; GIANNOCCARO, M.; LISO, V.. Early and Long-Term Engraftment after Autologous Peripheral Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia Patients **Acta Haematologica**, v. 116, p. 229-237, 2006.

SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. Stem cells find their niche. **Nature**, v.414, n.6859, p. 98-104, Nov. 2001.

SRIVASTAVA, A. S.; MALHOTRA, R.; SHARP, J.; BERGGREN, T. Potentials of ES cell therapy in neurodegenerative diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v.14, n.36, p. 3873-3879, 2008.

STIFF, P. J.; KOESTER, A. R.; WEIDNER, M. K.; DVORAK, K.; FISHER, R. I. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. **Blood**, v.70, n.4, p. 974-978, Oct. 1987.

SUDA, T.; ARAI, F.; HIRAO, A. Hematopoietic stem cells and their niche. **Trends in Immunology**, v.26, n.8, p. 426-433, Aug. 2005.

SUMIDA, S. Transfusion and transplantation of cryopreserved cells and tissues. **Cell Tissue Bank**, v. 7, n.4, p. 265-305, 2006.

SUMMERS, Y. J.; HEYWORTH, C. M.; DE WYNTER, E. A.; CHANG, J.; TESTA, N. G. Cord blood G(0) CD34+ cells have a thousand-fold higher capacity for generating progenitors in vitro than G(1) CD34+ cells. **Stem Cells**, v.19, n.6, p. 505-513, 2001.

SUREDA, A.; ARRANZ, R.; IRIONDO, A.; CARRERAS, E.; LAHUERTA, J. J.; GARCÍA-CONDE, J.; JARQUE, I.; CABALLERO, M. D.; FERRÀ, C.; LÓPEZ, A.; GARCÍA-LARAÑA, J.; CABRERA, R.; CARRERA, D.; RUIZ-ROMERO, M. D.; LEÓN, A.; RIFÓN, J.; DÍAZ-MEDIAVILLA, J.; MATAIX, R.; MOREY, M.; MORALEDA, J. M.; ALTÉS, A.; LÓPEZ-GUILLERMO, A.; DE LA SERNA, J.; FERNÁNDEZ-RAÑADA, J. M.; SIERRA, J.; CONDE, E.; GRUPO ESPAÑOL DE LINFOMAS/TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MÉDULA OSEA SPANISH COOPERATIVE GROUP. Autologous stem-cell transplantation for Hodgkin's disease: results and prognostic factors in 494 patients from the Grupo Español de Linfomas/Transplante Autólogo de Médula Osea Spanish Cooperative Group. **Journal of Clinical Oncology**, v.19, n.5, p. 1395-1404, Mar. 2001.

SUTHERLAND, H. J.; LANSDORP, P. M.; HENKELMAN, D. H.; EAVES, A. C.; EAVES, C. J. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.9, p. 3584-3588, May. 1990.

SUTHERLAND, D. R.; STEWART, A. K.; KEATING, A. CD34 antigen: molecular features and potential clinical applications. **Stem Cells**. v.11, suppl. 3, p. 50-57, Oct. 1993.

SUTHERLAND, D. R.; ANDERSON, L.; KEENEY, M.; NAYAR, R.; CHIN-YEE, I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. **Journal of Hematotherapy**, v.5, n.3, p. 213-226, Jun. 1996.

TAVIAN, M.; HALLAIS, M. F.; PÉAULT, B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. **Development**, v.126, n.4, p. 793-803, Feb. 1999.

TESTA, N.G. AND MOLINEAUX G. Haematopoiesis – A practical approach. In: **IRL Press at Oxford University Press**. Oxford New York Tokio, 1993. p. 84.

THOMAS, E. D.; LOCHTE, H. L. JR.; LU, W. C.; FERREBEE, J.W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **The New England journal of medicine**, v.257, n.11, p. 491-496, Sep. 1957.

THOMPSON, J. M.; CARLTON, P.; AKARD, L. P.; DUGAN, M. J.; JANSEN, J. Start in granulocyte-colony-stimulating factor (filgrastim) early after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation leads to faster engraftment without increased resource utilization. **Transfusion**, v. 49, n.3, p. 548-554, Mar. 2009.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES J. M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v.282, p. 1145-1147, Nov. 1998.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Journal of Radiation Research**, v.14, p. 213-222, Feb. 1961.

TRICOT, G.; JAGANNATH, S.; VESOLE, D.; NELSON, J.; TINDLE, S.; MILLER, L.; CHESON, B.; CROWLEY, J.; BARLOGIE, B. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. **Blood**, v.85, n.2, p.588-596, Jan 1995.

VOSE, J. M.; ARMITAGE, J. O. Bone marrow transplantation for Hodgkin's disease and lymphoma. **Annual Review of Medicine**, v.44, p. 255-263, 1993.

VOSE, J. M.; ARMITAGE, J. O. Clinical applications of hematopoietic growth factors. **Journal of Clinical Oncology**, v.13, n.4, p. 1023-1035, Apr. 1995.

WAGERS, A. J. Stem cell grand SLAM. **Cell**, v. 121, n.7, p. 967-970, Jul. 2005.

WATANABE, T.; TAKAUE, Y.; KAWANO, Y. Peripheral blood stem cell transplantation; an update. **The Journal of Medical Investigation**, v.44, n.1-2, p. 25-31, Aug. 1997.

WINDRUM, P.; MORRIS, T. C. Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v.31, n.4, p.315, Feb. 2003.

WINDRUM, P.; MORRIS, T.C.; DRAKE, M. B.; NIEDERWIESER, D.; RUUTU, T.; EBMT CHRONIC LEUKAEMIA WORKING PARTY COMPLICATIONS SUBCOMMITTEE. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. **Bone Marrow Transplantation**, v.36, n.7, p. 601-603, Oct. 2005.

XIAO, M.; DOOLEY, D. C. Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v.12, n.1, p. 115-122, Feb. 2003.

YAMASHITA, Y. Asymmetric stem cell division and pathology: insights from *Drosophila* stem cell systems. **The Journal of Pathology**, v.217, p. 181–185, 2009.

YANG H.; ACKER, J. P.; CABUHAT, M.; LETCHER, B.; LARRATT, L.; MCGANN, L. E. Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. **Bone Marrow Transplantation**, v.35, n.9, p. 881-887, May. 2005.

ZAGO, M. A. Células-Tronco: Origens e Propriedades. In: **Células-Tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 3-20.

ZENHÄUSERN, R.; TOBLER, A.; LEONCINI, L.; HESS, O. M.; FERRARI, P. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure. **Annals of Hematology**, v.79, n.9, p. 523-526, Sep. 2000.

ZHANG, F.; PASUMARTHI, K. B. Embryonic stem cell transplantation: promise and progress in the treatment of heart disease. **BioDrugs**, v.22, n.6, p. 361-374, 2008.

ZUCCOTTI, G.; STRASFELD, L.; WEINSTOCK, D. M. New agents for the prevention of opportunistic infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v.6, n.10, p. 1669-1679, Aug. 2005.

9 ANEXOS

Anexo I - Fichas para Coleta de Dados

Ficha para coleta de dados clínicos dos pacientes.

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Prontuário _____

Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: M F

2. Diagnóstico / doença de base:

3. Data do TMO (D ZERO): ____/____/____ Concentração Celular: _____

CD34⁺x10⁶/Kg infundido:

Células viáveis infundidas:

GMCFUx10⁴/Kg infundido:

GMCFUx10⁴/Kg viáveis infundido:

4. Tratamentos prévios:

S N

5. Tipo de tratamentos prévio:

QT Radioterapia

Descrição do tratamento:

6. Condicionamento:

7. Tempo em dias da pega do enxerto:

Neutrófilos \geq 500/ μ L:

Plaquetas \geq 20.000/ μ L:

Duração da neutropenia:

8. Episódio Febril:

S N

9. Classificação do Episódio Febril:

FOO Bacteremia

Clinicamente documentada sem bacteremia

Microbiologicamente Documentada

Tipo de agente microbológico:

10. Mortalidade:

S N

11. Tempo em dias de hospitalização:

Ficha para coleta de dados da criopreservação dos produtos de leucaféreses.

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Prontuário _____

Data de nascimento: ____/____/____

Peso: ____ Data da coleta: ____/____/____

Data da reinfusão: ____/____/____

2. Número de leucaféreses:

3. Número de bolsas criopreservadas:

4. Volume de bolsas criopreservadas:

5. Massa celular criopreservada:

6. Viabilidade celular:

Antes da criopreservação:

Após a criopreservação:

7. Percentual de Células Mononuclear:

8. Células CD34⁺:

9. CFU-GM:

Antes da criopreservação:

Após a criopreservação:

10. Concentração celular criopreservada:

Anexo II - Deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:

Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Associada

Secretário:

Zumara Rodrigues da Silva
Professora

Membros Titulares:

Beatriz Maria Alasia de Heredia
Médico - Prof.ª. Associada

Eduardo Jorge Bastos Côrtes
Médico - Prof. Assistente

Eliza Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre

Helena Warzynsky
Representante dos Usuários

Luzia da Conceição de Araújo Marques
Enfermeiro - Mestre

Mario Teixeira Antonio
Farmacêutico - Especialista

Nuzimar Conceição Fernandes
Médico - Prof. Associado

Paulo Feijó Barroso
Médico - Prof. Adjunto

Regiane de Fátima Rivelli
Farmacêutica - Doutoranda

Roberto Coury Pedrosa
Médico - Doutor

Anna Paola Trindade Rocha
Médico - Prof. Associado

Pierucci
Nutricionista - Professor Adjunto

Beatriz Moritz Trope
Médico - Doutora

Carlos Alberto Guimarães
Médico - Prof. Adjunto

Cesônia de Assis Martinusso
Jornalismo

Lucia Helena Luiza Vieira Amim
Médico - Mestre - Doutoranda

Marco Antonio Alves Brasil
Médico - Prof. Adjunto

Maria da Conceição Lopes Buarque - Assistente Social

Maria da Conceição Zacharias
Médico - Professor Assistente

Maria de Fátima Gustavo Lopes
Representante dos Usuários

Mariangélica Oliveira da Silva
Enfermeiro

Mário Fernando Petzhold
Engenheiro - Doutor

Orlando Nunes Cosenza
Sociólogo - Doutor

Rui Haddad
Médico - Prof. Adjunto

CEP - MEMO – n.º 646/08

Rio de Janeiro, 04 de setembro de 2008.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Sibelle Mattos Flores

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 025 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 140/08 - CEP

Título: “Criopreservação de Células-Tronco Hematopoéticas do Sangue Periférico – Impacto sobre a Recuperação Celular e na Pega do Enxerto no Transplante Autólogo.”

Pesquisador (a) responsável: Dra. Sibelle Mattos Flores

Data de apreciação do parecer: 01/09/2008

Parecer: "APROVADO."

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 01/03/2009, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof.ª. Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)