

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
NÚCLEO DE HEMATOLOGIA E TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

PATRICIA ELKIKI DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS CD34+ POR CITOMETRIA DE FLUXO EM
PACIENTES EM MOBILIZAÇÃO COM G-CSF E A ASSOCIAÇÃO COM A
LEUCOMETRIA**

Juiz de Fora

2018

PATRICIA ELKIKI DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS CD34+ POR CITOMETRIA DE FLUXO EM
PACIENTES EM MOBILIZAÇÃO COM G-CSF E A ASSOCIAÇÃO COM A
LEUCOMETRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Elias Hallack Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariza Aparecida Mota

Juiz de Fora

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos Espíritos de Luz pela presença constante em minha vida, dando força para superar cada obstáculo.

Aos meus pais, Georgeon e Salomita, agradeço pela maneira como fui educada, pelos exemplos que são para mim, e por sempre me incentivarem a realizar meus sonhos.

À minha irmã Michele por todo amor a mim dedicado, e por sempre me apoiar nas minhas escolhas.

Ao meu companheiro Tássio Bruno, que esteve ao meu lado me apoiando e incentivando com todo carinho e dedicação, obrigada por cuidar de mim. Amo-te!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Abrahão Elias Hallack Neto, pela orientação e paciência que teve comigo no desenvolvimento do trabalho.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Mariza Aparecida Mota, pelo apoio e tranquilidade com que me orientou.

A minha best friend Valesca, pela amizade, pelas palavras essenciais nos momentos mais difíceis, e inestimável contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Ribeiro, pelo carinho e dedicação na orientação estatística deste trabalho.

A amiga Irene, pela orientação estatística e organização dos resultados.

As amigas Kelli Borges, pelo incentivo para ingressar no mestrado e essencial ajuda na elaboração do projeto de pesquisa e Paula Morais pela colaboração na construção do projeto e nas análises das amostras.

Aos colegas do Hospital e Maternidade Monte Sinai, em especial o Enf. Rodrigo Andrade, pela colaboração na pesquisa de prontuários.

Aos pacientes, que gentilmente aceitaram participar da pesquisa.

“Tenha coragem de seguir o que o seu coração e sua intuição dizem. Eles já sabem o que você realmente deseja. Todo resto é secundário”.

(Steve Jobs)

RESUMO

Introdução: O uso de células progenitoras hematopoéticas mobilizadas no sangue periférico tornaram-se a fonte preferencial para transplante autólogo. Alguns fatores podem afetar a mobilização de células CD34+ no transplante autólogo de células progenitoras hematopoéticas (TACPH). Este estudo teve como objetivo avaliar a influência desses fatores e correlacionar com a contagem de células CD34+ pré-aférese. **Método:** Estudo prospectivo que envolveu a avaliação de pacientes submetidos a mobilização de células progenitoras hematopoéticas com fator de crescimento de granulócitos (G-CSF) para realizar o transplante autólogo. Foi realizada quantificação de células CD34+ no sangue periférico pré-aférese e no produto final. Foi determinado a quantidade de células CD34+ relacionada com menor número de coletas para se obter o valor necessário para a realização do transplante, além da associação com os dados clínicos e laboratoriais. **Resultados:** Do total de 34 pacientes, 85% tinham mais que 20.000 leucócitos/ μ l. Dos pacientes que apresentaram falha na mobilização, 100% apresentaram leucometria inferior a 20.000 leucócitos/ μ l. Houve diferença estatisticamente significativa na associação entre o CD34+ pré-aférese e as variáveis idade ($p=0,025$), leucometria ($p<0,001$) e células mononucleares ($p=0,001$) do sangue periférico. O CD34+ ≥ 14 células/ μ l pré-aférese teve relação com um melhor rendimento dessas células no produto final e com a necessidade de apenas uma coleta para se obter a quantidade necessária para realizar o TACPH. **Conclusão:** Esse estudo demonstra que a contagem de células CD34+ relacionada com a idade e a leucometria pré-aférese do paciente, foi o único fator associado estatisticamente com o número de coletas e com rendimento do produto final.

Palavras-chave: antígeno CD34+, células progenitoras hematopoéticas, mobilização, transplante autólogo de células progenitoras, citometria de fluxo.

ABSTRACT

Introduction: The use of hematopoietic progenitor cells mobilized in the peripheral blood became the preferred source for autologous transplantation. Some factors may affect the mobilization of CD34+ cells in autologous transplantation of hematopoietic progenitor cell (ATHPC). This study aimed to evaluate the influence of these factors and to correlate with the pre-apheresis CD34+ cell count. **Method:** This is a prospective study evaluating 34 patients submitted to the mobilization of hematopoietic progenitor cells with granulocyte growth factor (G-CSF). Quantification of CD34+ cells in the peripheral blood pre-apheresis and in the final product of the apheresis was performed. The amount of CD34+ cells related to fewer collections was determined to obtain the value needed for the transplantation, in addition to the association with clinical and laboratory data. **Results:** Out of the 34 patients, 85% had more than 20,000 leukocytes / μl . Of the patients who presented failure during mobilization, all presented $< 20,000$ leukocytes / μl . There was a statistically significant difference in the association between pre-apheresis CD34+ and the variables age ($p = 0.025$), leukocyte count ($p < 0.001$) and mononuclear cells ($p = 0.001$) in peripheral blood. Pre-apheresis CD34+ ≥ 14 cells/ μl was related to better yield of these cells in the final product and with the need for only one collection to obtain the minimum cumulative yield of 2×10^6 CD34+/Kg. **Conclusion:** This study demonstrates that the age-related CD34+ cell count and patient pre-apheresis leukocyte count was the only factor statistically associated with the number of collections and yield of the final product.

Keywords: Stem Cell, antigens, CD34, Hematopoietic stem cell transplantation, flow cytometry, mobilization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para quantificação de células CD34+	30
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema simplificado da hematopoese.....	17
Figura 2. Citometria de Fluxo	20
Figura 3. Evolução da mobilização.....	21
Figura 4. Quantificação das CTH CD34+ do sangue periférico através da citometria de fluxo.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASBMT	<i>American Society for Blood and Marrow Transplantation</i>
BD	Becton Dickinson
CD	Cluster de diferenciação
CF	Citometria de fluxo
CFU-GM	<i>Colony forming unit granulocyte-macrophage</i> (Unidades formadoras de colônias de macrófagos e granulócitos)
CPH	Células progenitoras hematopoéticas
CPHSP	Células progenitoras hematopoiéticas do sangue periférico
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CXC GRO β	Receptores de quimiocinas C-X-C GRO β
CXCR2	Receptores de quimiocinas C-X-C tipo 2
CXCR4	Receptores de quimiocinas C-X-C tipo 4
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Classificação de Células Ativadas por Fluorescência)
FITC	Fluoresceína
FSC	<i>Forward scatter</i> (dispersão frontal)
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
IMUNOCET	Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada
ISHAGE	<i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i> (Sociedade Internacional de Hematoterapia e Engenharia de Enxerto)
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i> (Metaloproteinase-9 da matriz)

MNC	Células mononucleares
MO	Medula óssea
PE	Ficoeritrina
PGRSS	Programa de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde
SDF1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i> (Fator 1 derivado de células estromais)
SP	Sangue periférico
SSC	Side scatter (dispersão lateral)
TACPH	Transplante Autólogo de Células Progenitoras Hematopoéticas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão celular vascular 1)
VLA4	<i>Very Late Antigen-4</i> (Antígeno 4 muito tardio)
WBC	<i>White blood cells</i> (Glóbulos brancos)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivo Específico.....	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Células Progenitoras Hematopoéticas	16
3.1.1 Identificação e Quantificação.....	18
3.2 Mobilização de Células Progenitoras Hematopoéticas	20
3.3 Fatores que Influenciam na Mobilização	24
4. MÉTODO.....	27
4.1 Pacientes	27
4.2 Coleta de Dados	27
4.2.1 Coleta das Amostras de SP para Quantificação de Células Cd34+	29
4.2.2 Quantificação do número de células CD34+	29
4.2.3 Coleta de dados sociodemográficos, clínicos, terapêuticos e laboratoriais.....	31
4.3 Análise Estatística.....	32
4.4 Aspectos Éticos.....	32
5. RESULTADOS	34
6. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	36
APÊNDICES.....	46
ANEXOS	49

1. INTRODUÇÃO

O transplante de células isoladas da medula óssea tem dado substancial benefício terapêutico para pacientes que sofrem de doenças hematológicas. Células progenitoras hematopoiéticas do sangue periférico (CPHSP) de indivíduos adultos e células do sangue do cordão umbilical são fontes alternativas de células progenitoras hematopoiéticas em transplantes humanos (GLUCKMAN, 2001). A quimioterapia de alta dose e o transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH) tem potencial de prolongar a sobrevivência e a cura em várias doenças malignas hematológicas (OZKURT et al, 2010).

As células progenitoras hematopoiéticas (CPH) constituem de 0,01 a 0,1% das células do sangue periférico (SP) e de 1 a 3% de todas as células da medula óssea (MO) de doadores saudáveis não estimulados (LEVESQUE et al, 2002; GOLUBEVA et al, 2014).

O CD34 é um antígeno de superfície glicosilado e preferencialmente expresso por células progenitoras hematopoiéticas. Há uma relação do CD34 com o papel de adesão celular, podendo estar envolvido com sinais de transdução que regulam a expressão de outros genes relacionados à hematopoese. Esse antígeno é expresso na maioria das células primitivas e progressivamente menos expresso nas células diferenciadas (HOLYOAKE; ALCORN, 1994).

A mobilização é a habilidade de promover a circulação periférica das CPH, que se localizam na MO. Uma das maneiras de proporcionar a mobilização das células CD34+ é com o uso de agentes quimioterápicos associados com fatores de crescimento hematopoiéticos (G-CSF), ou G-CSF sozinho (MASSUMOTO; MASSUMOTO; AYOUB, 2011).

Diversos fatores têm sido relatados por afetar a mobilização, como por exemplo, idade, sexo, tipo de doença, condições da medula óssea, quimioterapia e radioterapia prévia e estabilidade da contagem de células CD34+ do SP (FORD et al, 2003; DESIKAN et al, 2001).

Atualmente, as CPHSP têm sido estimadas por contagem de células mononucleares (MNC), unidades formadoras de colônias de macrófagos e granulócitos (CFU-GM), e contagem de células CD34 positivas. A contagem de

células CD34+ é realizada pelo método de citometria de fluxo e é utilizada na maioria dos centros de Transplante de Medula Óssea. Além de ser um método confiável, permite a obtenção de resultado em poucas horas. Embora a dose ótima de CD34+ para infusão não seja conhecida, a utilização de 2×10^6 por quilo de peso do paciente tem sido associada com a pronta recuperação hematológica após a terapia mieloablativa (LARGHERO; GARCIA; GLUCKMAN, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado a correlação entre a contagem de células CD34+ e o rendimento da coleta de CPHSP (BENDER et al, 1992; ANGUITA et al, 1998). Em geral, durante a mobilização com quimioterapia das células da medula óssea para o SP, as células CD34+ aumentam quando os leucócitos alcançam um nível de 1000/ μ L. O pico de CD34 é obtido quando o número de leucócitos é maior que 3000/ μ L, principalmente com monocitose e níveis de plaquetas subnormal. Alguns centros de transplante iniciam a contagem de células CD34+ quando há pelo menos 4000 leucócitos/ μ L (ANGUITA et al, 2010).

É possível observar que a determinação de células CD34+ é imprescindível para a determinação da coleta de células-tronco hematopoéticas e atualmente determinada por meio de legislação. A Portaria GM 931 de 2006, determina que para o transplante alogênico haja uma contagem mínima de células CD34+ para realização tanto do aparentado quanto do não aparentado, de 2×10^6 células/kg, e para o transplante alogênico de sangue de cordão umbilical de 3×10^7 células CD34+/kg. Para o TACPH a mesma portaria afirma apenas que é necessária quantidade adequada de células para realização do transplante (BRASIL, 2006).

De acordo com o consenso da American Society for Blood and Marrow Transplantation (ASBMT), o valor mínimo de células para a realização de TACPH é de 2×10^6 células CD34+/kg, porém a decisão de realizar o TACPH entre 1×10^6 e 2×10^6 células CD34+/kg pode ser individualizado de acordo com cada paciente, sendo o objetivo para um TACPH o valor de 3×10^6 células CD34+/kg. (GIRALT et al, 2014).

Para realização da coleta, os pacientes permanecem sob acompanhamento laboratorial por cinco dias em média até atingir a contagem ideal de células CD34+. Além disso, alguns pacientes não conseguem obter o número mínimo de células CD34+ para realização do transplante de células progenitoras hematopoéticas de SP, sendo que os motivos para determinação da falha de mobilização ainda são obscuros.

Embora muitos estudos demonstrem uma clara relação entre o número de células CD34+ no SP e o rendimento da coleta, que é a quantidade de células CD34+ coletadas por aférese, ainda há divergência sobre número de células CD34+ no SP necessário para o início da coleta de células tronco hematopoéticas.

Com vistas em avaliar os fatores relacionados ao paciente que influenciem a obtenção das células CD34+, e o melhor rendimento da coleta dessas de células, possibilitando com isso otimizar o processo, desenvolvemos um estudo prospectivo com pacientes submetidos a mobilização de CPH com G-CSF.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a influência do número de células de CD34+ no primeiro dia da coleta com o rendimento do produto final da aférese.

2.2 Objetivo Específico

- Avaliar fatores que possam interferir no rendimento da coleta de CPH em pacientes submetidos à primeira mobilização com G-CSF para o TACPH.
- Avaliar os fatores do paciente que possam influir na contagem de CD34+ no SP durante a mobilização.
- Relacionar o número de células CD34+ com número de leucócitos e células mononucleares no SP.

Hipótese

Pacientes em mobilização para coleta de CPH para TACPH com leucometria elevada apresentam maior quantidade de células CD34+ e estas estão relacionadas a um melhor rendimento do produto final da aférese.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Células Progenitoras Hematopoéticas (CPH)

Há mais de um século, Artur Pappenheim cunhou o conceito de célula tronco ancestral comum que corresponde a célula que pode dar origem a todas as linhagens do sistema hematopoético (LAJTHA,1980). As células-tronco hematopoéticas (CTH) são células que tem a capacidade de se auto renovar e se diferenciar em células especializadas do tecido sanguíneo e células do sistema imune. Constituem as células-tronco adultas mais bem caracterizadas até hoje (SILVA JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009).

As células-tronco hematopoéticas possuem capacidade única de produzir progenitores celulares (figura 1) mais diferenciados e células filhas, mantendo assim, a capacidade de auto renovação (DEVETEN; ARMITAGE, 2007). As CPH se originam da diferenciação das CTH, perdendo o seu potencial de auto renovação, passando a serem comprometidas com uma das vias de diferenciação celular, e assim não podem reverter ou parar o processo de diferenciação (LOEBINGER; JANES, 2007).

As células do organismo apresentam marcadores moleculares em sua superfície que permitem identificar à qual linhagem pertencem e os diferentes estágios de maturação em que se encontram. Estas proteínas são classificadas como *Cluster of Differentiaton* (CD) e estão associadas com a diferenciação e maturação celular, e podem ser detectadas por citometria de fluxo (SERKE et al, 1998).

O antígeno CD34 é o marcador das células-tronco hematopoéticas, e está presente de 1% a 4% das células da MO responsáveis pela formação das colônias hematopoéticas, e que são capazes de reconstituir a hematopoese, indicando a presença das células progenitoras pluripotentes na medula óssea. No SP a quantidade de células CD34+ encontra-se em valores inferiores, correspondendo a 1/10 da concentração da MO, em condições normais (BENDER et al,1991; VIGORITO; CARMINO,2009).

O CD34 é uma glicofosfoproteína transmembrana expressa em todas as CPH, em células endoteliais de pequenos vasos e fibroblastos embrionários. Este marcador foi descoberto a partir do desenvolvimento de anticorpos que reconhecem

especificamente uma pequena fração de células da MO humana, mas não reconhecem células linfóides ou células sanguíneas maduras (KRAUSE et al, 1996).

Nas células progenitoras mais primitivas são expressos altos níveis de CD34, mas à medida que se diferenciam em formas morfológicamente distinguíveis, vão perdendo progressivamente a expressão de CD34. Pode ser que o CD34 desempenhe um papel central nos primeiros eventos hematopoiéticos, talvez mediando interações cruciais célula a célula e / ou célula para estroma (HOLYOAKE; ALCORN, 1994).

Inicialmente identificada em 1984 em populações de CTH, a proteína CD34 possui peso molecular de aproximadamente 115 KDa, e o gene se encontra no braço longo do cromossomo um, uma região contendo inúmeros outros codificadores de moléculas de adesão e sinalização intercelular (SUTHERLAND; KEATING, 1992, HOLYOAKE; ALCORN, 1994).

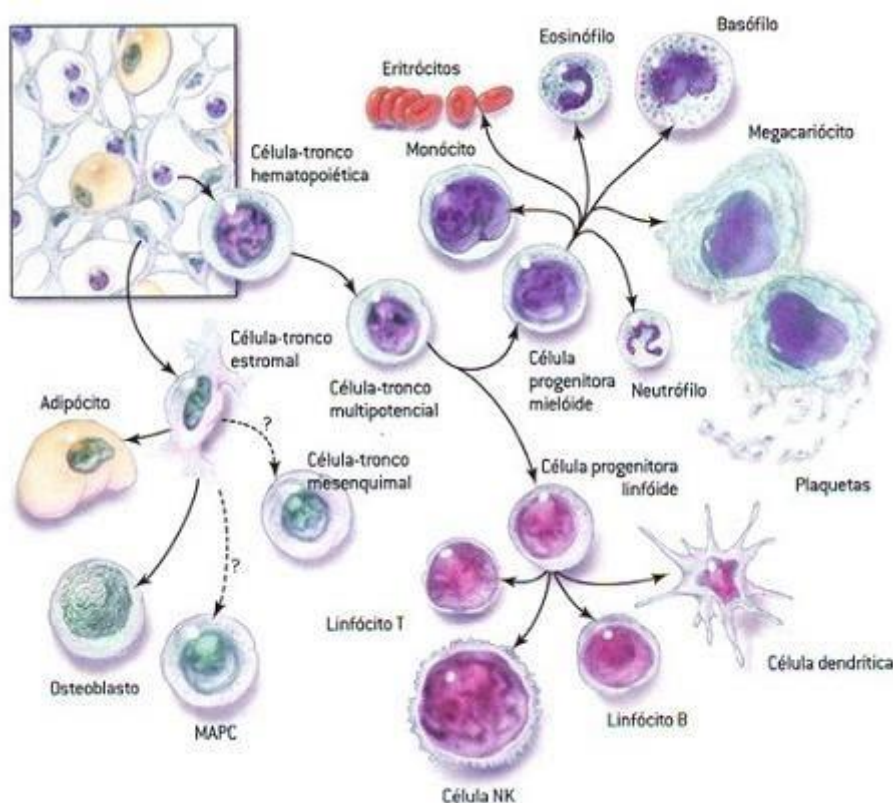


Figura 1 Esquema simplificado da hematopoese. Fonte: cadernodefarmacia.blogspot.com.br, 05/02/2018.

3.1.1 Identificação de Células CD34+

O primeiro anticorpo anti-CD34, denominado My10, foi um produto do hibridoma gerado de um camundongo imunizado com linhagem celular KG1a de leucemia mielóide (KRAUSE et al,1996).

Desde a identificação do CD34, a citometria de fluxo tem sido utilizada para quantificar as CPH de SP e produtos de aférese (LOWDELL; BAINBRIDGE, 1996; LEUNER et al, 1998). A decisão de iniciar a leucoaférese após a mobilização dessas células depende da contagem no SP, e a quantidade coletada no produto de aférese pode determinar o tempo de uma futura aférese. A quantificação precisa de células CD34+ na aférese é necessária para avaliar a qualidade da coleta para pega da medula após TACPHSP (LUMLEY et al, 1996).

A contagem de células CD34+ de SP é rotineiramente utilizada na maioria dos centros de transplante de medula óssea, pois os resultados estão disponíveis em aproximadamente duas horas. (ZIMMERMANN et al, 1995; ANGUITA et al, 2010)

A citometria de fluxo (CF) é uma tecnologia que permite analisar diferentes características celulares simultaneamente (ORFAO et al,1995), onde podem ser determinadas diversas propriedades físicas e biológicas de uma célula. A linhagem celular e suas subpopulações podem ser determinadas pelo número e tipo de antígeno de superfície, intracitoplasmático ou intranuclear, o que possibilita a quantificação e classificação imunofenotípica das células, possibilitando assim, o rastreamento rápido de várias populações celulares, a quantificação de pequenas populações com muita especificidade e sua separação para estudos posteriores (BACAL; FAULHABER, 2003).

Os parâmetros celulares medidos dessa maneira podem ser divididos em dois grupos principais: 1) aqueles relacionados à dispersão de luz, que reflete principalmente o tamanho da célula e sua complexidade interna, e 2) aqueles associados à presença de um ou mais fluorocromos dentro da célula ou ligados à membrana da superfície celular, seja de forma natural (autofluorescência) ou artificial (ou seja, usando anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo ou substâncias fluoróforas) (ORFAO et al, 1995).

As análises das amostras começam quando há passagem de uma célula em frente a um raio laser, fazendo com que a luz deste se disperse em todas as direções. Faz-se a detecção da luz dispersada frontalmente (forward scatter-FSC) que avalia o tamanho da célula, e lateralmente (side scatter-SSC) para análise da complexidade interna. Ainda, a intensidade de fluorescência emitida pelos fluorocromos para detecção de antígenos de superfície diferentes, chamado imunofenotipagem (ROITT et al., 2003).

As células da amostra em suspensão marcadas com fluorocromos específicos para detecção de moléculas de superfície são aspiradas e passam em fila, envolvidas por uma solução tampão, para o interior do citômetro através de um canal de fluxo, onde incide um laser, sendo que passam em fila simples cerca de 500 a 4000 células ou partículas por segundo por meio do sensor eletrônico (ROITT et al., 2003). Nesse mesmo local, detectores internos captam e enviam sinais fluorescentes que são medidos por um computador (Figura 2). Os sinais fluorescentes são plotados em gráficos com escala logarítmica ou linear, o que possibilita a distinção entre populações celulares normais e patológicas (ORFAO et al., 1995).

A quantificação de células CD34+ pode ser determinada contando leucócitos totais por meio de um analisador hematológico, seguido de contagem de células CD34+ por citometria de fluxo (GOLUBEVA et al, 2014). O CD45 é uma importante glicoproteína transmembrana que se expressa em todas as células hematopoéticas nucleadas (DONOVAN e KORETZKY, 1993). O protocolo da International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE), baseia-se na aquisição de toda informação disponível de quatro parâmetros: espalhamento da luz dianteira e lateral e intensidade de fluorescência dos anticorpos monoclonais anti-CD34 e anti-CD45 (SUTHERLAND et al, 1996).

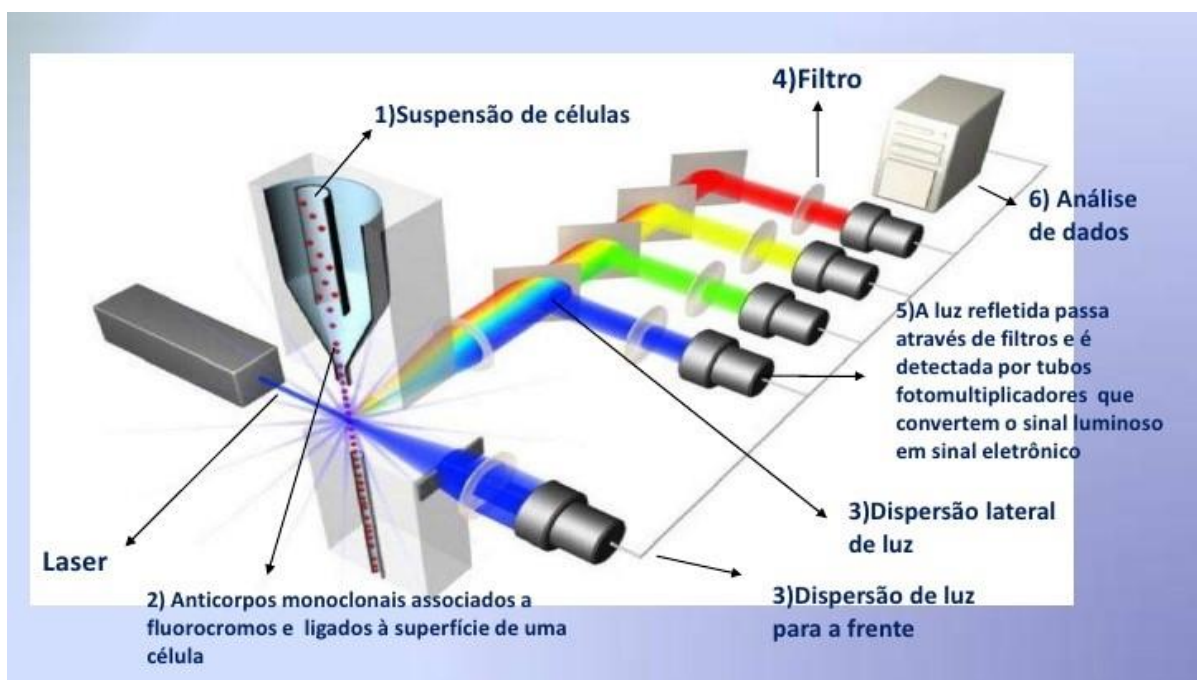


Figura 2. Citometria de Fluxo. Fonte: <https://pt.slideshare.net/labimuno/c-i-t-o-m-e-t-r-i-a-d-e-f-l-u-x-o>. Acessado em 10/02/2018.

3.2 Mobilização de Células Progenitoras Hematopoéticas

A coleta de um número adequado de células CD34+ por aférese, para a realização do TACPH, requer mobilização dessas células para o SP. Com o evoluir dos anos o entendimento do processo de mobilização (Figura 3), levou a padronização do G-CSF isoladamente ou em associações, como principal medicação para a mobilização no TACPH (IKEDA; KOZUKA; HARADA, 2004; GREINIX; WOREL, 2009; SAKASHITA et al, 2018).

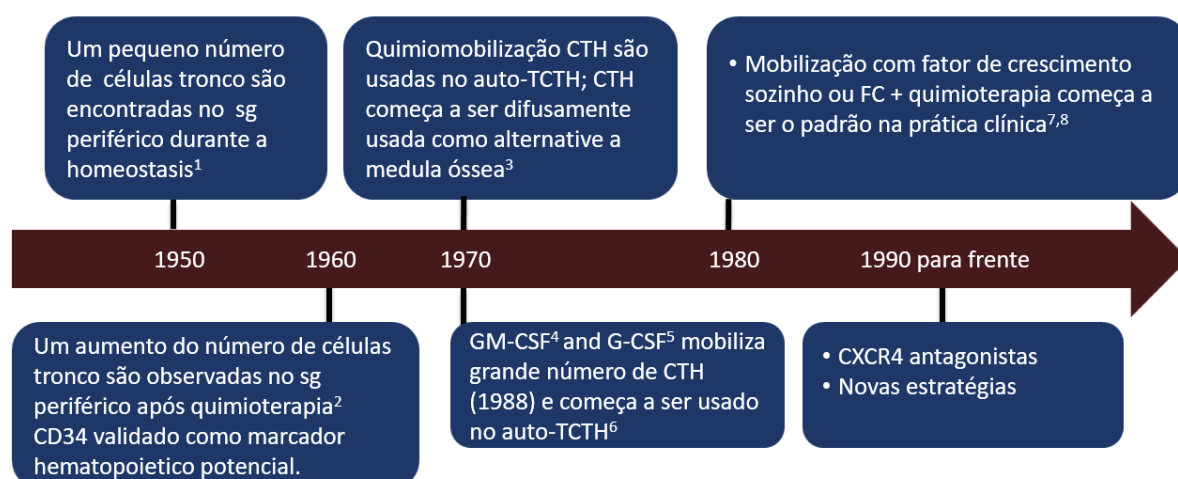


Figura 3. Evolução da mobilização. Fonte: cortesia de Luciano J. M. Costa.

Referências da figura 3: 1. Goodman JW, Hodgson GS. *Blood*. 1962;19:702-714. 2. Richman CM et al. *Blood*. 1976;74:1031-1039 3. Kessinger A et al. *Blood*. 1988;71:723-727. 4. Socinski MA et al. *Lancet*. 1988;1:1194-1198 5. Duhrsen U et al. *Blood*. 1988;72:2074-2081. 6. Gianni AM et al. *Lancet*. 1989;2:580-585. 7. Bensinger W et al. *J Clin Oncol*. 1995;13:2547-2555. 8. Tricot G et al. *Blood*. 1995;85:588-596.

Apesar das células hematopoiéticas maduras serem liberadas fisiologicamente da MO para o SP, somente cerca de 0,05% ou menos dos leucócitos totais circulantes são CPH e expressam o marcador CD34 (MOHTY; HO, 2011). As CPH aderem ao microambiente medular por diversas interações adesivas. Além disto, elas expressam um vasto conjunto de receptores de superfície, como moléculas de adesão associadas a angiopoietina-1 de linfócitos, antígeno 4 muito tardio (VLA4), e Mac-1, receptores de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4) e tipo 2 (CXCR2), as glicoproteínas de superfície CD44 e CD62L, e receptor de tirosina quinase c-kit (BENSINGER; DIPERSIO; MCCARTY, 2009). O estroma medular contém o fator 1 da célula estromal (SDF-1), a quimiocina CXC GRO- β , a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), o ligante KIT, o ligante de glicoproteína P-selectina e o ácido hialurônico, sendo todos ligantes para moléculas de adesão das células estaminais (BONIG; PAPAYANNOPOULOU, 2012).

O método mais simples de mobilizar CPH da MO para o SP é a administração de fator de crescimento de colônia de granulócitos (G-CSF) ou o uso de fator de crescimento de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF). Esses fatores

estimulam a produção de neutrófilos, a maturação e a liberação de protease, com isso, levando a uma ruptura da ligação entre as células progenitoras CD34+ e o estroma medular (COSTA et al, 2014).

O G-CSF é uma potente citocina produzida por vários tipos celulares da linhagem hematopoética como os monócitos, células progenitoras endoteliais, fibroblastos, células precursoras mesenquimais e cardiomiócitos. Ele regula a produção e acelera a maturação de neutrófilos dentro da MO e a sua liberação para o SP (ZHANG et al., 2011).

Os fatores de crescimento possuem dois principais mecanismos de ação, sendo o primeiro a produção de proteases por séries mielomonocíticas hiperplásicas, que leva a clivagem de SDF-1, impedindo sua ligação a CXCR4, sendo a metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9) a protease mais estudada. O segundo mecanismo é induzido por proteólise como o primeiro, sendo responsável pela degradação de VCAM-1, osteopontina e fibronectina, levando a uma menor adesão das CPH através do seu receptor VLA-4 no estroma da medula óssea (ALVAREZ et al, 2013; ANGELOPOULOU et al, 2014).

O uso isolado de fatores de crescimento permite um intervalo mais curto entre o início da mobilização e o transplante, e está relacionada a uma menor morbidade, particularmente inferior taxa de infecção associada ao cateter e menor índice de internação hospitalar (ALEGRE et al, 1997; DESIKAN et al, 1998; GERTZ et al, 2009). Contudo, esta terapêutica muitas vezes não consegue atingir o número alvo de CPHs, especialmente em pacientes demasiadamente pré-tratados (MOSKOWITZ et al, 1998), pacientes com infiltração anterior na MO (MICALLEF et al, 2000; KUITTINEN et al, 2004) e pacientes expostos a lenalidomida (KUMAR et al ,2007; POPAT et al, 2009, COSTA et al, 2011).

De acordo com o consenso da Società Italiana Di Emaferesi e Manipolazione Cellulare (SIDEM) e Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO), a dose de G-CSF recomendada é de 10 mg/ kg/ dia, e de preferência administração fracionada, por exemplo, duas vezes ao dia, até que a dose alvo tenha sido coletada, durante um período máximo de 5 dias, desde que a contagem de leucócitos do sangue (WBC) não exceda 60.000/ μ L (PIERELLI, et al., 2012), doses superiores a 16 mg/kg/dia não

aparentam elevar o número de células mobilizadas de maneira significativa (TO et al., 1997).

A associação de GCSF com quimioterapia atinge dois objetivos, o de mobilização e atividade antitumoral, e demonstra que resulta em um maior rendimento de células CD34+ em relação ao uso isolado do GCSF (DAZZI, 2000; TO, 2011).

A escolha de utilizar o G-CSF como mobilização de primeira linha é uma opção atrativa por causa da previsível cinética de mobilização, que permite prever o agendamento de aféreses e pessoal, ao mesmo tempo a redução dos custos dos fatores de crescimento e do procedimento de coleta em comparação com ciclofosfamida (CHAO, 2011; HOGGATT, 2012; SALVINO, 2016).

São utilizados regimes com ciclofosfamida com diferentes doses ou esquema de poliquimioterapia para linfoma em associação com o G-CSF. A benesse de um maior rendimento na mobilização com doses mais elevadas de quimioterapia necessita ser equilibrada mediante a necessidade de mais transfusões de hemácias e plaquetas, e frequentemente, hospitalização por neutropenia febril e se justifica quando existem efeitos antitumorais significativos (DINGLI, 2006; TO, 2011).

A ciclofosfamida pode ser incluída nos ciclos iniciais de indução ou na terapia de resgate, ou pode ser administrada como um ciclo independente separadamente da terapia padrão. (TO, 2011) O uso da ciclofosfamida está associado a taxas de falha de mobilização menores ou similares as do G-CSF isolado (CHAO et al, 2011; HOGGAT; PELUS, 2012; MOHTY et al, 2014), com cinética de enxertia melhorada (DASSI et al ,2000; SIZEMORE et al, 2010), porém pode resultar em mais toxicidade, hospitalizações e custos mais elevados (DINGLI et al, 2006; PUSIC et al, 2008; SHEPPARD et al,2012).

O Plerixafor mobiliza as CPH através do bloqueio específico da ligação do SDF-1 α ao seu receptor CXCR4 (PETIT et al, 2002; LEVESQUE et al, 2003). Durante o seu desenvolvimento, descobriu-se que o composto aumenta a contagem de leucócitos no SP, e que é capaz de mobilizar CPH da MO (ROSENKILDE et al, 2004).

O Plerixafor é administrado de 10 a 11 horas antes do primeiro dia planejado para aférese, e é administrado geralmente uma dose subcutânea de 240 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. Em algumas publicações é descrito o uso bem-sucedido de plerixafor com a administração

de 5 horas na noite anterior à aférese (ABHYANKAR et al, 2011). Apresenta um pico de mobilização de células CD34+ da MO para a corrente sanguínea de horas após a sua administração, em contrapartida ao G-CSF, que necessita aproximadamente entre 4 a 6 dias de administração para alcançar resultados semelhantes (HONG et al., 2012).

A quantificação de células CD34+ no SP deve ser realizada na manhã da aférese, porém o início da mesma não deve ser adiado. Podem ser necessárias de duas a três doses diárias de plerixafor em alguns pacientes. Em doadores saudáveis, o plerixafor é eficaz como agente único ou em combinação com G-CSF (LILES et al, 2003)

A segurança e a eficácia do plerixafor foram demonstradas em pacientes com linfoma ou mieloma múltiplo (STIFF et al, 2009). No entanto, a eventual produção de células usando plerixafor como primeira escolha para mobilização em todos os pacientes que foram submetidos a coleta de CTH por aférese foi a mesma em comparação com o uso de plerixafor somente naqueles que falharam na mobilização do G-CSF. A desvantagem do uso inicial do plerixafor é o aumento dos custos de medicamentos (TO; LEVESQUE; HEBERT, 2011).

3.3 Fatores que Influenciam na Mobilização

Vários fatores são citados por afetar a mobilização, como a idade avançada, alterações mielodisplásicas secundárias, o envolvimento pela doença na medula óssea, quimioterapia e radioterapia prévias (STIFF et al, 2000; ÖZKURT et al, 2010; ANGUITA et al, 2010).

A falha de mobilização é observada frequentemente em pacientes com mais de 60 anos de idade (HUI et al, 2003; KOENIGSMANN et al, 2004). Primeiramente, há uma "senescência" relacionada à idade da CPH real devido ao encurtamento progressivo de telômeros (CALADO; YOUNG, 2008). Em segundo lugar, há uma redução na reserva de CTH causada pela função de nicho diminuída em camundongos mais antigos com depleção de células-tronco mesenquimais e osteoprogenitores (MAYACK et al, 2010). Em terceiro lugar, o envelhecimento é normalmente associado a uma diminuição acentuada na formação óssea e números

de osteoblastos em superfícies endosteais, portanto, os nichos osteoblásticos endosteais para CTH provavelmente estão reduzidos (ZHU et al, 2007; KOHLER et al, 2009).

Os fatores de risco clínicos para uma má mobilização com regimes convencionais foram bem descritos. Essa pode ser inata e inerente a uma combinação genética particular específica para um indivíduo, ou adquirida como consequência do envelhecimento, tratamentos ou doenças anteriores. Os possíveis defeitos podem ser de um ou mais três níveis: 1) número insuficiente de CPH devido a fatores intrínsecos dessas células, 2) número insuficiente de CPH devido ao número baixo ou nichos defeituosos, 3) número ou resposta inadequada de células efetora / suporte, como macrófagos ou nervos β -adrenérgicos da MO. Esses possíveis defeitos não são mutuamente exclusivos, mas a abordagem terapêutica para corrigi-los pode ser específica para cada um (TO, 2011).

O envolvimento da MO pela doença está associado a rendimentos de coleta ruins (MICCALLEF, 2000; KUITTINEN,2004). Podem ocorrer números reduzidos de CPH parcialmente relacionados ao comprometimento de nichos saudáveis por células malignas na MO (COLMONE, 2008) ou competição direta entre CPH e células malignas para um número limitado de nichos (SHIOJZAWA,2011). Além disso, o linfoma não-Hodgkin versus Hodgkin (HOSING, 2009), doença linfoproliferativa indolente (MICCALLEF, 2000) e leucemia aguda (KOENIGSMANN, 2004) foram todos identificados como fatores de risco independentes. Ainda não foi determinado os aspectos específicos da fisiopatologia dessas doenças que influenciam a mobilização (TO, 2011).

A quimioterapia anterior correlaciona-se com a incapacidade de mobilização em pacientes para TACPH. A maioria dos tratamentos citotóxicos e moléculas utilizadas em terapias direcionadas podem ter efeitos danosos sobre CPH e os nichos em que residem. Ainda, os agentes de ligação cruzada do DNA, tais como o melfalano ou a carmustina (CLARK, 1998), e os análogos de purina, como a fludarabina, estão associados com um risco muito elevado de falha de mobilização (TOURNILHAC, 2004).

Os fármacos citotóxicos que não visam especificamente células que progridem através da fase S do ciclo celular (por exemplo, antraciclinas, cisplatina, fludarabina,

carmustina, melfalan) podem potencialmente matar células CPH e nichos quiescentes, reduzindo assim a reserva CPH. A fludarabina é tóxica tanto para os progenitores hematopoiéticos, quanto para o nicho, sendo um duplo impacto nos mecanismos de mobilização (BERGER, 2008).

Os regimes altamente intensivos e com doses elevadas, como o regime hyper-CVAD, estão associados a um alto risco de falha de mobilização quando utilizados além dos primeiros 2-4 ciclos de terapia (HILL, 2011). Os ciclos sucessivos de quimioterapia recrutam cada vez mais CPH no ciclo celular, e com isso leva ao rápido esgotamento do potencial de autorrenovação e reconstituição da CPH. Os ciclos repetidos de quimioterapia também podem prejudicar nichos para CPH e células efectoras de macrófagos da MO. A lenalidomida está associada a uma má mobilização, particularmente após mais de 4 ciclos de tratamento (KUMAR, 2009), podendo suprimir a mobilidade de CPH semelhante à forma como reduz a motilidade das células endoteliais da medula no mieloma múltiplo (DE LUISI, 2011). O efeito anti-angiogênico da lenalidomida também pode prejudicar a mobilização (LEVESQUE, 2007).

O imatinib administrado por longo período tem sido associada com a redução do osso (VANDYKE, 2010), o que pode afetar a função de nicho de CPH. Os rendimentos foram melhorados quando os pacientes suspenderam temporariamente o imatinib por 3 semanas antes da coleta (HUI, 2003).

A radioterapia prévia está associada à incapacidade de mobilização (STIFF, 1999), provavelmente devido à combinação da toxicidade direta à CPH, toxicidade de nicho e toxicidade para as células de suporte de nicho. A radioterapia também pode aumentar a expressão de inibidores de protease, como α 1-antitripsina, que diminuirão a tempestade de protease durante a mobilização (VAN PEL et al, 2006).

4. MÉTODO

Trata-se de um estudo longitudinal, prospectivo, quantitativo, observacional, que avaliou a mobilização das CPH no SP em pacientes submetidos a TACPH e relacionando com fatores do paciente com potencial de interferir no processo.

4.1 Pacientes

Em virtude do tamanho da amostra analisada, foi realizado um estudo não probabilístico, com 59 pacientes submetidos ao TACPH entre fevereiro de 2016 e julho de 2017, nos serviços de transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário (UFJF) e do Hospital e Maternidade Monte Sinai.

Foram incluídos no estudo pacientes que foram submetidos ao TACPH de SP, de ambos os sexos, qualquer idade, portadores de mieloma múltiplo ou linfoma, que mobilizaram somente com G-CSF, e que aceitaram participar do estudo, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram excluídos aqueles pacientes que mobilizaram com G-CSF associada a quimioterapia, ou que não tiverem critérios clínicos para realização do TACPH.

Foi determinado arbitrariamente a quantidade mínima de células CD34+ no SP relacionada com menor número de coletas para obtenção do valor necessário de células para a realização do TACPH, os pacientes foram divididos em dois grupos, um grupo com valor abaixo da quantidade mínima determinada e o outro grupo com pacientes que obtiveram a quantidade mínima ou mais de células CD34+.

Foi considerado como falência de mobilização quando após o período de até 5 dias com G-CSF o paciente não atingia o valor de 10 células CD34+/ μ l. O valor mínimo no produto final definido para a realização do TACPH foi de 2×10^6 CD34/Kg.

4.2 Coleta de Dados

Para alcançar os objetivos propostos foram realizadas duas etapas de coleta de dados: coletas de amostras de SP para quantificação de células CD34+ e coleta de dados sociodemográficos, clínicos, terapêuticos e laboratoriais.

As variáveis categóricas foram divididas da seguinte maneira:

- Sexo;
- Diagnóstico foi dividido em duas categorias, Mieloma Múltiplo e Linfomas, a categoria Linfomas englobou Linfoma de Hodgkin e Linfoma não-Hodgkin;
- Status da doença dividiu-se em “com remissão completa” e “sem remissão completa”, considerou-se “sem remissão completa aqueles indivíduos com remissão parcial ou refratário;
- Número de protocolos refere-se aos diferentes tipos/associações de quimioterápicos utilizados sendo categorizado em um protocolo (indivíduos que utilizaram apenas um esquema de quimioterapia, independente da(s) droga(s) ou dois protocolos ou mais (indivíduos que utilizaram dois ou mais esquema de quimioterapia, independente das drogas);
- Ciclos de quimioterapia dividido em pacientes que realizaram até quatro ciclos ou pacientes que realizaram mais de quatro ciclos;
- Número de coletas de aférese foi classificado em uma coleta ou mais de uma.
- Radioterapia;

As variáveis numéricas foram:

- Idade;
- Número de leucócitos no SP (μL) pré-leucaférese;
- Número de células mononucleares no SP (μL) pré-leucaférese;
- Número de células CD34+ no SP (μL) pré-leucaférese;
- Porcentagem de células CD34+ no SP pré-leucaférese (%CD34+);
- Número de células CD34+ no produto final da aférese;
- Número de plaquetas no SP (μL) pré-leucaférese;
- GCSF/Kg/dia.

4.2.1 Coleta das Amostras de SP para Quantificação de Células CD34+

As amostras foram coletadas em tubo com EDTA, contendo 4 ml de SP, coletado pela equipe de enfermagem dos respectivos centros de transplante e enviados ao Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET), situado no Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, para realização da leucometria global e quantificação das células CD34+ por citometria de fluxo.

No quarto dia de mobilização com G-CSF iniciava-se a contagem de leucócitos totais e quantificação das células CD34+ por citometria de fluxo.

A quantificação das células CD34+ foi realizada no citômetro de fluxo Fluorescence Activated Cell Analyser, FACSCalibur, Becton Dickinson (BD) e a análise dos resultados foi realizado no software de análise Cell Quest (BD). Para garantir a qualidade e a segurança dos resultados a cada rotina o citômetro foi calibrado com esferas de calibração do fornecedor (BD).

A leucometria global das amostras foram realizadas no contador hematológico Mindray BC-2800, a cada rotina era utilizada uma amostra controle para garantia dos resultados.

As amostras de sangue dos pacientes foram descartadas de acordo com o PGRSS (Programa de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde) do IMUNOCET e da UFJF.

4.2.2 Determinação do percentual de células CD34+

Para quantificação de células CD34+, foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal anti-CD45 conjugado com fluoresceína (FITC), anticorpo monoclonal anti-CD34 conjugado com ficoeritrina (PE), anticorpo monoclonal isotipo IgG1-PE (controle negativo).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para quantificação de CD34+

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Fabricante
Anti-Hu CD34	PE	581	EXBIO
Anti-Hu CD45	FITC	MEM-28	EXBIO
Mouse IgG1 Isotype Control	PE	MOPC-21	EXBIO

No protocolo utilizado a concentração de células foi ajustada para 2×10^6 células/ μ l, em um volume final entre 50 μ l e 100 μ l.

4.2.2.1 Técnica de citometria de fluxo para identificação de células CD34+

- Foram identificados dois tubos de poliestireno de 12mm x 75mm, um como CD34+ e outro como IgG1;
- No tubo CD34+ foi adicionado 10 μ l de CD45/FITC + 10 μ l de CD34/PE;
- No tubo IgG1 foi adicionado 10 μ l de CD45/FITC + 10 μ l de isotipo IgG1/PE;
- Foi adicionado aos dois tubos uma alíquota da amostra de SP, com volume entre 50 μ l e 100 μ l;
- Os tubos foram homogeneizados no agitador vortex e incubados por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegida da luz;
- Após a incubação foi adicionado em cada tubo 2 ml de solução de lise;
- As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos ao abrigo da luz;
- Foi realizada a leitura do número de células CD34+ no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson);
- A leitura foi realizada até que se obtivesse o mínimo de 100 células CD34+ lidas.

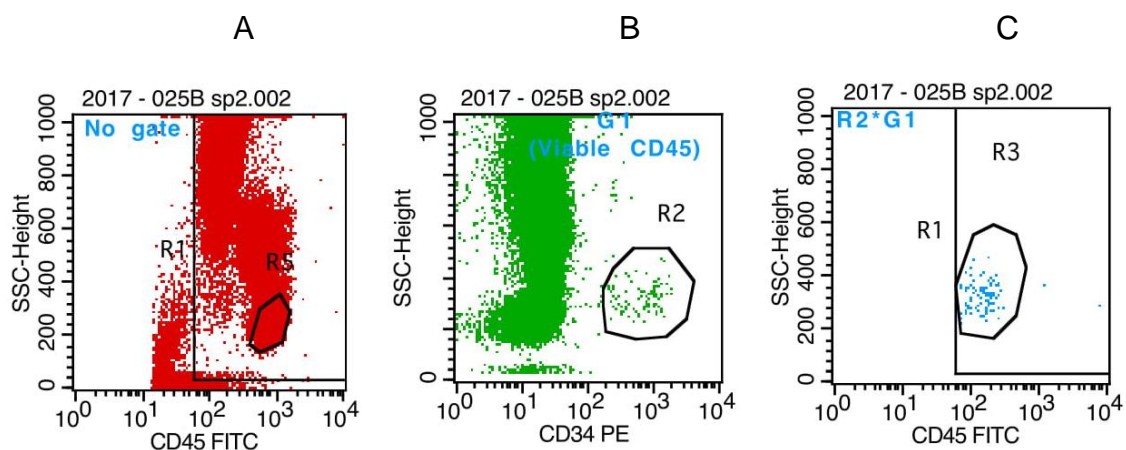


Figura 4. Quantificação das CTH CD34+ do sangue periférico através da citometria de fluxo. Gráfico A: Determina população de células CD45+ (R1), excluindo plaquetas, hemácias e debris celulares, a região R5 são células linfomononucleares; Gráfico B: Determina a partir da região R5 os eventos positivos para células CD34+ com menor granularidade (R2); Gráfico C: Determina a partir da região R2 todos os eventos CD34+ e CD45+ de baixa expressão.

4.2.3 Coleta de dados sociodemográficos, clínicos, terapêuticos e laboratoriais

Para a obtenção dos dados sociodemográficos, clínicos, terapêuticos e laboratoriais, elaboramos um instrumento de coleta para consulta retrospectiva nos prontuários (apêndice B). Os participantes do estudo foram avaliados quanto ao sexo, idade, doença, status da doença na mobilização, número de protocolos quimioterápicos, número de ciclos, realização de radioterapia, G-CSF/Kg/dia, número de coletas, leucometria global no SP, número de células CD34+ no SP, porcentagem de CD34+ no SP, nº de plaquetas no SP, nº de CD34+ no produto final.

4.3 Análise Estatística

Os dados coletados para o estudo foram reunidos para análise descritiva e inferencial, por meio de distribuições de frequências, medianas, mínimo e máximo, média e desvio padrão apresentados por meio de tabelas.

A associação entre a variável CD34 categorizada e as variáveis numéricas foi realizada por meio do teste *t de Student* não pareado. Para escolha deste teste estatístico verificou-se a distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e teste de homogeneidade de variância de Levene.

Para associação entre variáveis categóricas foi empregado o teste qui-quadrado (CD34+ categorizado e sexo, quantitativo de coletas, doença, radioterapia, ciclos de quimioterapia, status da doença na mobilização e número de protocolo). O teste foi escolhido atendendo aos pressupostos de nenhuma casela da tabela de valores esperados menor que 1 e 80% maior ou igual a 5.

As análises foram realizadas no programa estatístico *Statistical Package for Social Science*® (SPSS) versão 17.0. Para os valores estatisticamente significativos foi considerado o valor de $p \leq 0,05$ para a rejeição da hipótese de nulidade.

4.4 Aspectos Éticos

A pesquisa foi submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário da UFJF e aprovada pelo parecer consubstanciado nº 1.419.207 e CAAE 53105615.9.0000.5133. (anexo A).

Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo B) foi elaborado conforme as normas da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e entregue aos indivíduos que aceitaram de forma espontânea a participar do estudo. A leitura do TCLE foi realizada com todos os participantes, esclarecendo os objetivos do estudo, todos os seus direitos e sanando dúvidas que porventura houvessem. Após a leitura, foi solicitada a assinatura para os que concordaram em participar do estudo. Uma cópia do documento foi entregue a cada entrevistado e outra ficou arquivada.

Sendo assim, por se tratar de pesquisa que envolve a participação de seres humanos, foram respeitadas as determinações da Resolução nº 466/12 do CNS, de forma a garantir que os preceitos éticos e legais fossem evidenciados em todo o processo de obtenção e análise dos dados. Ressalta-se que o anonimato e o sigilo dos participantes foram garantidos.

5. RESULTADOS

Os resultados e sua discussão estão apresentados no artigo “*The importance of quantification of CD34 in the mobilization of hematopoietic progenitor cells*” (Apêndice A). O artigo foi submetido à revista acadêmica *Archives of Medical Research* (anexo C).

6. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra a importância da contagem de células CD34+ no SP em prever a eficácia das coletas por aférese e bom rendimento do produto final. Embora outros fatores influenciem na capacidade de mobilização dessas células, como a idade e leucometria do SP, a utilização apenas desses fatores para definir as medicações a serem utilizadas na mobilização podem levar a um super ou subtratamento dos pacientes, com impactos nos custos do procedimento, além da exposição a riscos do uso de medicações às vezes desnecessárias. Assim a utilização da contagem de CD34 no SP deve ser estimulada para guiar condutas nas mobilizações de pacientes a serem submetidos a TACTH.

REFERÊNCIAS

- ABHYANKAR, S.; DEJARNETTE, S.; ALJITAWI, O., GANGULY S, MERKEL D, MCGUIRK J. A risk-based approach to optimize autologous hematopoietic stem cell (HSC) collection with the use of plerixafor. **Bone Marrow Transplant**, vol 47, p. 483–487, July. 2011.
- ALEGRE, A.; TOMAS, J. F.; MARTINEZ-CHAMORRO, C.; GIL-FERNANDEZ, J. J.; FERNANDEZ-VILLALTA, M. J.; ARRANZ, R. et al. Comparison of peripheral blood progenitor cell mobilization in patients with multiple myeloma: high-dose cyclophosphamide plus GM-CSF vs G-CSF alone. **Bone Marrow Transplant**, vol. 20, p. 211–217, July. 1997.
- ALVAREZ, P.; CARRILLO, E.; VELEZ, C.; HITA-CONTRERAS, F.; MARTINEZ-AMAT, A.; RODRIGUEZ-SERRANO, F. et al. Regulatory systems in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing. **Biomed Res Int**. 2013.
- ANGELOPOULOU, M.K.; TSIRKINIDIS, P.; BOUTSIKAS, G.; VASSILAKOPOULOS, T. P.; TSIRIGOTIS, P. New insights in the mobilization of hematopoietic stem cells in lymphoma and multiple myeloma patients. **Biomed Res Int**. Aug. 2014
- ANGUITA, T.; DIBARRART, M. T.; MONTALVA, R. et al: Transplantes con precursores hematopoyéticos de sangre periférica: utilidad práctica del conteo de células CD34_ vs comparación de técnicas citométricas. **Revista Chilena de Cancerología y Hematología** 8:15, 1998
- ANGUITA-COMPAGNON, A. T.; DIBARRART, M. T.; PALMA, J. et al. Mobilization and collection of peripheral blood stem cells: guidelines for blood volume to process, based on CD34-positive blood cell count in adults and children. **Transplant Proc**, vol. 42, n. 1, p. 339-344. Jan-Feb. 2010.
- AULT, K. A. Flow cytometric measurement of platelet associated immunoglobulin. **Pathol Immunopathol Res**, vol 7, p. 395-408. 1988.
- BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003, p.90.
- BENDER, J. G.; UNVERZAGT, K. L.; WALKER, D. E.; LEE, W.; VAN EPPS, D. E.; SMITH, D. H. et al. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. **Blood**, vol. 77, n.12, p.2591-6, June .1991.

BENDER, J. G.; TO, L. B.; WILLIAMS, S. et al: Defining a therapeutic dose a peripheral blood stem cells. **J Hematother**, vol.1, n. 4, p. 329-341, Jan. 1992.

BENSINGER, W.; APPELBAUM, F.; ROWLEY, S.; et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. **J Clin Oncol**, vol 13, n.10, p. 2547-2555, Oct. 1995.

BENSINGER, W.; DIPERSIO, J. F.; MCCARTY, J. M. Improving stem cell mobilization strategies: future directions. **Bone Marrow Transplant**, vol. 43, n. 3, p. 181-195, Jan. 2009.

BERGER, M. G.; BERGER, J.; RICHARD, C. et al. Preferential sensitivity of hematopoietic (HPs) and mesenchymal (MPs) progenitors to fludarabine suggests impaired bone marrow niche and HP mobilization. **Leukemia**, vol. 22, p. 2131-2134, July. 2008.

BONIG, H.; PAPAYANNOPOULOU, T. Mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells: general principles and molecular mechanisms. **Methods Mol Biol**. 904:1–14. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria GM/MS Nº 931, de 2 de maio de 2006. Aprova o Regulamento Técnico para Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 03 de maio de 2006.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere maintenance and human bone marrow failure. **Blood**, vol. 111, n. 9, p. 4446-4455, May. 2008.

CHAO, N. J.; GRIMA, D. T.; CARRUM, G.; HOLMBERG, L.; FUNG, H. C.; BROWN, S. et al. Chemo-mobilization provides superior mobilization and collection in autologous stem cell transplants but with less predictability and at a higher cost. **Blood** (ASH Annual Meeting Abstracts). 2011;118:4048.

CITOMETRIA DE FLUXO. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/labimuno/c-i-t-o-m-e-t-r-i-a-d-e-f-l-u-x-o>>. Acesso em: 10/02/2018.

CLARK, R. E.; BRAMMER, C. G. Previous treatment predicts the efficiency of blood progenitor cell mobilisation: validation of a chemotherapy scoring system. **Bone Marrow Transplant**, vol. 22, n. 9, p. 859-863, June. 1998.

COLMONE, A.; AMORIM, M.; PONTIER, A. L.; WANG, S.; JABLONSKI, E.; SIPKINS, D. A. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. **Science**, vol. 322 (5909), p. 1861-1865, dec. 2008.

COSTA LJ, ALEXANDER ET, HOGAN KR, et al. Development and validation of a decision-making algorithm to guide the use of plerixafor for autologous hematopoietic stem cell mobilization. **Bone Marrow Transplantation**. 2011 (46): 64–69.

COSTA LJ, NISTA EJ, BUADI FK, et al. Prediction of Poor Mobilization of Autologous CD34+ Cells with Growth Factor in Multiple Myeloma Patients: Implications for Risk-Stratification. **Biol Blood Marrow Transplant**, vol. 20, n. 2, p. 222-228, Feb. 2014.

DAZZI, C.; CARIELLO, A.; ROSTI, G. et al. Is there any difference in PBPC mobilization between cyclophosphamide plus G-CSF and G-CSF alone in patients with nonHodgkin's Lymphoma? **Leuk Lymphoma**, vol. 39 (3-4), p. 301-310, May. 2000.

DE LUISI, A.; FERRUCCI, A.; COLUCCIA, A. M. et al. Lenalidomide restrains motility and overangiogenic potential of bone marrow endothelial cells in patients with active multiple myeloma. **Clin Cancer Res**. 2011.

DESIKAN, K. R.; BARLOGIE, B.; JAGANNATH, S.; VESOLE, D. H.; SIEGEL, D.; FASSAS, A. et al. Comparable engraftment kinetics following peripheral-blood stem-cell infusion mobilized with granulocyte colony-stimulating factor with or without cyclophosphamide in multiple myeloma. **J Clin Oncol**, vol. 16, n. 4, p. 1547–1553, Apr. 1998.

DESIKAN, K. R.; TRICOT, G.; MUNSHI, N. C.; et al. Preceding chemotherapy, tumor load and age influence engraftment in multiple myeloma patients mobilized with granulocyte colony-stimulating factor alone. **Br J Haematol**, vol. 112, n. 1, p. 242-247, Jan. 2001.

DEVETTEN, M.; ARMITAGE, J. O. Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. **Ann Oncol**, vol. 18, n. 9, p. 1450-6, sept. 2007.

DINGLI, D.; NOWAKOWSKI, G. S.; DISPENZIERI, A.; et al. Cyclophosphamide mobilization does not improve outcome in patients receiving stem cell transplantation for multiple myeloma. **Clin Lymphoma Myeloma**, vol.6, n. 5, p. 384-388, Mar. 2006.

DONOVAN, J. A.; KORETZKY, G. A. CD45 and the immune response. **J Am Soc Nephrol**, vol. 4 n. 4, p. 976-985. Oct. 1993.

DUHRSEN, U.; VILLEVAL, J. L.; BOYD, J.; KANNOURAKIS, G. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic

progenitor cells in cancer patients. **Blood**, vol. 72, n. 6, p. 2074-2081, December. 1988.

FORD, C. D.; CHAN, K. J.; REILLY, W. F. et al: An evaluation of predictive factors for CD34₊ cell harvest yields from patients mobilized with chemotherapy and growth factors. **Transfusion**, vol. 43, n. 5, p. 622-625, Apr. 2003.

GERTZ, M.A.; KUMAR, S.K.; LACY, M.Q.; DISPENZIERI, A.; HAYMAN, S.R.; BUADI, F. K. et al. Comparison of high-dose CY and growth factor with growth factor alone for mobilization of stem cells for transplantation in patients with multiple myeloma. **Bone Marrow Transplant**, vol. 43, n. 8, p. 619–625, Apr. 2009.

GIANNI, A. M.; BREGNI, M. ; STERN, A. C.; SIENA, S. ; TARELLA, C. ; PILERI, A.; et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. **The Lancet**, vol.334, n. 8663, p. 580-585, Sept. 1989.

GIRALT, S.; COSTA, L.; SCHRIEBER, J.; DIPERSIO, J.; MAZIARZ, R.; MCCARTY, J. et al. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. **Biol Blood Marrow Transplant**, vol. 20, n. 3, p. 295–308, 2014.

GLUCKMAN, E. Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood. **N Engl. J Med**, vol. 344, n. 24, p. 1860-1, June. 2001.

GOLUBEVA, V.; MIKHALEVICH, j.; NOVIKOVA, J.; TUPIZINA, O.; TROFIMOVA, S.; ZUEVA, Y. Novel cell population data from a haematology analyzer can predict timing and efficiency of stem cell transplantation. **Transfusion and Apheresis Science**, vol. 50, n. 1, p. 39–45, Feb. 2014.

GOODMAN, J. W.; HODGSON, G. S. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. **Blood**, vol. 19, n. 6, June. 1962.

GREINIX, H. T.; WOREL, N. New agents for mobilizing peripheral blood stem cells. **Transfus Apher Sci**, vol. 41, n. 1, p. 67–71, Aug. 2009.

HEMATOPOIESE. Disponível em: <cadernodefarmacia.blogspot.com.br>. Acesso em: 05/02/2018.

HILL, B. T.; RYBICKI, L.; SMITH, S. et al. Treatment with hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone combined with cytarabine and methotrexate results in poor mobilization of peripheral blood stem cells in patients with mantle cell lymphoma. **Leuk Lymphoma**. 2011.

HOGGATT, J.; PELUS, L. M. Hematopoietic stem cell mobilization with agents other than G-CSF. **Stem Cell Mobilization**, p.49–67, July.2012.

HOLYOAKE, T. L.; ALCORN, M. J. CD34 positive hematopoietic cells: Biology and clinical applications. **Blood**, vol. 8, n. 2, p. 113-124, June. 1994.

HONG, K .T.; KANG, H. J.; KIM, N. H.; KIM, M. S.; LEE, J. W.; KIM, H. Successful mobilization using a combination of plerixafor and G-CSF in pediatric patients who failed previous chemomobilization with G-CSF alone and possible complications of the treatment. **J Hematol Oncol**, vol. 5:14, Mar. 2012.

HOSING, C; SALIBA, R. M.; AHLAWAT, S. et al. Poor hematopoietic stem cell mobilizers: a single institution study of incidence and risk factors in patients with recurrent or relapsed lymphoma. **Am J Hemato**, vol. 84, n. 6, p. 335-337, June. 2009.

HUI, C. H.; GOH, K. Y.; WHITE, D. et al. Successful peripheral blood stem cell mobilisation with filgrastim in patients with chronic myeloid leukaemia achieving complete cytogenetic response with imatinib, without increasing disease burden as measured by quantitative real-time PCR. **Leukemia**, vol. 17, n. 5, p. 821-828, Apr. 2003.

IKEDA, K.; KOZUKA, T.; HARADA, M. Factors for PBSC collection efficiency and collection predictors. **Transfus Apher Sci**, vol. 31, n. 3, p. 245–259, Dec. 2004.

KESSINGER, A.; ARMITAGE, J. O.; LANDMARK, J. D.; SMITH, D. M. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. **Blood**, vol. 71, n. 3, p. 723-727, March.1988.

KOENIGSMANN, M.; JENTSCH-ULLRICH, K.; MOHREN, M.; BECKER, E.; HEIM, M. FRANKE A. The role of diagnosis in patients failing peripheral blood progenitor cell mobilization. **Transfusion**, vol. 44, n. 5, p. 777-784, Apr. 2004.

KOHLER, A.; SCHMITHORST, V.; FILIPPI, M-D. et al. Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. **Blood**, vol. 114, n. 2, p. 290-298, July. 2009.

KRAUSE D. S; FACKLER, M. J.; CIVIN, C. I.; MAY, W. S. CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. **Blood**, vol. 87, n.1, p. 1-13, Jan. 1996.

KUITTINEN, T.; NOUSIAINEN, T.; HALONEN, P.; MAHLAMAKI, E.; JANTUNEN, E. Prediction of mobilisation failure in patients with non-Hodgkin's lymphoma. **Bone Marrow Transplant**, vol.33, p. 907–912, Mar. 2004.

KUMAR, S.; DISPENZIERI, A.; LACY, M. Q.; HAYMAN, S. R.; BUADI, F. K.; GASTINEAU, D. A. et al. Impact of lenalidomide therapy on stem Decision-making algorithm for HSC mobilization cell mobilization and engraftment post-peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed myeloma. **Leukemia**, vol. 21, p. 2035–2042, June. 2007.

KUMAR, S.; GIRALT, S.; STADTMAUER, E. A. et al. Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide-, lenalidomide-, or bortezomib-containing regimens. **Blood**, vol.114, n. 9, p.1729-1735. Aug. 2009.

LAJTHA, L. G. Bone marrow. The seedbed of blood. In: Wintrobe MM ed. *Blood, pure and eloquent*. New York. McGraw Hill, 1980: 57-79.

LARGHERO, J.; GARCIA, J.; GLUCKMAN, E. Sources and procurement of allogeneic stem cells in EBMT Handbook. **Haematopoietic Stem Cell Transplantation**. 5th ed. Evreux; 2008.

LEUNER, S.; ARLAND, M.; KAHL, C.; JENTSCH-ULLRICH, K.; FRANKE, A. AND HÖFFKES, H-G. Enumeration of CD34-positive hematopoietic progenitor cells by flow cytometry: comparison of a volumetric assay and the ISHAGE gating strategy. **Bone Marrow Transplantation**, vol. 22, p. 699–706, Sep. 1998.

LEVESQUE, J-P.; HENDY, J.; TAKAMATSU, Y.; SIMMONS, P. J.; BENDALL, L. J. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. **J Clin Invest**, vol. 111, n. 2, p. 187-196, Jan. 2003.

LEVESQUE, J-P.; WINKLER, I. G.; HENDY, J. et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1a and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. **Stem Cells**, vol. 25, n. 8, p. 1954-1965, May. 2007

LILES, W. C.; BROXMEYER, H. E.; RODGER, E. et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. **Blood**, vol. 102, n. 8, p. 2728-2730, Oct. 2003.

LOEBINGER, M.R.; JANES, S. M. Stem Cells for Lung Disease. **Chest**, vol. 132, n. 1 p. 279-285, July. 2007.

LOWDELL, M. W.; BAINBRIDGE, D. R. External quality assurance for CD34 cell enumeration – results of a preliminary national trial. **Bone Marrow Transplant**, vol. 17, n. 5, p. 849–853, May. 1996.

LUMLEY, M. A.; MCDONALD, D. F.; CZARNECKA, H. M. et al. Quality assurance of CD34+ cell estimation in leucapheresis products. **Bone Marrow Transplant**, vol. 18, n. 4, p. 791–796, Oct. 1996.

MASSUMOTO, C.; MASSUMOTO, S. M.; AYOUB, C. A. **Células-Tronco: como coletar, processar e criopreservar**. 1ª Ed. São Paulo. Atheneu. 2011.

MAYACK, S. R.; SHADRACH, J. L.; KIM, F. S.; WAGERS, A. J. Systemic signals regulate ageing and rejuvenation of blood stem cell niches. **Nature**, vol. 463(7280), p. 495-500, Jan. 2010.

MICALLEF, I. N.; APOSTOLIDIS, J.; ROHATINER, A. Z.; WIGGINS, C.; CRAWLEY, C. R.; FORAN, J. M. et al. Factors which predict unsuccessful mobilisation of peripheral blood progenitor cells following G-CSF alone in patients with non-Hodgkin's lymphoma. **Hematol J**, vol. 1, p. 367–373, 2000.

MOHTY, M.; HO, A. D. In and out of the niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. **Exp Hematol**, vol. 39, n. 7, p. 723–729, July. 2011.

MOHTY, M.; HUBEL, K.; KROGER, N.; ALJURF, M.; APPERLEY, J.; BASAK, G. W. et al. Autologous haematopoietic stem cell mobilisation in multiple myeloma and lymphoma patients: a position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplant**, vol. 49, n. 7, p. 865–872, Mar. 2014.

MOSKOWITZ, C. H.; GLASSMAN, J. R.; WUEST, D.; MASLAK, P.; REICH, L.; GUCCIARDO, A. et al. Factors affecting mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with lymphoma. **Clin Cancer Res**, vol. 4, n. 2, p. 311–316. Feb. 1998.

ORFAO, A.; RUIZ-ARGUELLES, A. Citometria De Flujo Y Su Aplicacion En Hematologia. in: LOPEZ BORRASCA A, AROCHA PIRANGO C, CAMPOS GUERRA C, PARREIRA A, PAVLOVSKY S, RUIZ-ARGUELLES G, SAN MIGUEL JF, eds. **Enciclopedia de Hématología Iberoamericana**. Universidad de Salamanca, 1993:161-75.

ORFAO, A.; RUIZ-ARGUELLES, A.; LACOMBE, F.; AULT, K.; BASSO, G.; DANOVA, M. FLOW CYTOMETRY: ITS APPLICATIONS IN HEMATOLOGY. **Haematologica**, vol. 80, p. 69-81, 1995.

ÖZKURT, Z. N.; YEGIN, Z. A.; SUYANI, E.; AKI, S. Z.; ACAR, K.; YAGCI, M. et al. Factors affecting stem cell mobilization for autologous hematopoietic stem cell transplantation. **J Clin Apher**, vol 25, n. 5, p. 280-286, July. 2010.

PETIT, I.; SZYPER-KRAVITZ, M.; NAGLER, A. et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. **Nat Immunol**, vol 3, n. 7, p. 687-694, June. 2002.

PIRELLI, L.; PERSEGHIN, P.; MARCHETTI, M.; ACCORSI, P.; FANIN, R.; MESSINA, C.; OLIVIERI, A.; RISSO, M.; SALVANESCHI, L.; BOSI, A. and for Società Italiana Di Emaferesi and Manipolazione Cellulare (SIDEM) and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). Best practice for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection in adults and children: results of a Società Italiana Di Emaferesi e Manipolazione Cellulare (SIDEM) and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO) consensus process. **Transfusion**. Volume 52, 893–905, April 2012

POPAT, U.; SALIBA, R.; THANDI, R.; HOSING, C.; QAZILBASH, M.; ANDERLINI, P. et al. Impairment of filgrastim-induced stem cell mobilization after prior lenalidomide in patients with multiple myeloma. **Biol Blood Marrow Transplant**, vol. 15, p. 718–723, 2009.

PUSIC, I.; JIANG, S. Y.; LANDUA, S.; UY, G. L.; RETTIG, M. P.; CASHEN, A. F. et al. Impact of mobilization and remobilization strategies on achieving sufficient stem cell yields for autologous transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, vol 14, n. 9, p 1045-1056, Sep. 2008.

RICHMAN, C. M.; WEINER, R. S.; YANKEE, R. A. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. **Blood**, vol. 47, n. 6, p. 1031-1039, June. 1976

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. Sao Paulo: Guanabara Koogan, 2003. 481p.

ROSENKILDE, M. M.; GERLACH, L. O.; JAKOBSEN, J. S.; SKERLJ, R. T.; BRIDGER, G. J.; SCHWARTZ, T. W. Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. **J Biol Chem**, vol. 279, n. 4, p. 3033–3041, Jan. 2004.

SALVINO, M. A.; RUIZ, J. Hematopoietic progenitor cell mobilization for autologous transplantation – a literature review. **Rev Bras Hematol Hemoter**, vol 38, n.1, p. 28-36, Jan- Feb. 2016.

SARKODEE-ADOO, C.; TARAN, I.; GUO, C. et al. Influence of preapheresis clinical factors on the efficiency of CD34₊ cell collection by large-volume apheresis. **Bone Marrow Transplant**, vol. 31, p. 851, May. 2003

SERKE, S.; BEYER, J.; RICK, O. et al. Analysis of CD34-expressing cells in clinical practice. **Vox Sang**, vol. 74, n. S2, p. 469-475, June. 1998. Volume 74, Issue S2

SILVA JUNIOR, F.C.; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, vol. 31(Supl. 1), p. 53-58. 2009

SHEPPARD, D.; BREDESON, C.; ALLAN, D.; TAY, J. Systematic review of randomized controlled trials of hematopoietic stem cell mobilization strategies for autologous transplantation for hematologic malignancies. **Biol Blood Marrow Transplant**, vol. 18(8), p.1191–1203. 2012.

SHIOZAWA, Y.; PEDERSEN, E. A.; HAVENS, A. M. et al. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. **J Clin Invest**, vol. 121, n. 4, p. 1298-1312, Mar. 2011.

SOCINSKI, M. A.; ELIAS, A.; SCHNIPPER, L.; CANNISTRA, S. A.; ANTMAN, K. H.; GRIFFIN, J. D. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. **The Lancet**, vol. 331, n. 8596, p.1194-1198, May.1988.

STIFF, P. J. Management strategies for the hard-to-mobilize patient. **Bone Marrow Transplant**, vol. 23, p. S29-S33, Apr. 1999.

STIFF, P.; MICALLEF, I.; MCCARTHY, P. et al. Treatment with plerixafor in nonHodgkin's lymphoma and multiple myeloma patients to increase the number of peripheral blood stem cells when given a mobilizing regimen of G-CSF: implications for the heavily pretreated patient. **Biol Blood Marrow Transplant**, vol. 15, n. 2, p. 249-256, Feb. 2009.

SUTHERLAND, D. R.; KEATING, A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. **J Hematother**. 1992; 1(2): 115-29.

SUTHERLAND, D. R.; ANDERSON, L.; KEENEY, M. et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. **J Hematother**1996;5: 213–226.

TO, L. B.; HAYLOCK, D. N.; SIMMONS, P. J.; JUTTNER, C. A. The biology and clinical uses of blood stem cells. **Blood**, vol. 89, n. 7, p. 2233–2258, Apr. 1997.

TO, L. B.; LEVESQUE, J. P.; HERBERT, K. E. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. **Blood**, vol. 118, n. 17, p. 4530-4540, Aug. 2011.

TOURNILHAC, O.; CAZIN, B.; LEPRETRE, S. et al. Impact of frontline fludarabine and cyclophosphamide combined treatment on peripheral blood stem cell mobilization in B-cell chronic lymphocytic leucemia. **Blood**, vol. 103, n. 1, p. 363-365, Jan. 2004.

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

VAN PEL, M.; VAN OS, R.; VELDERS, G. A. et al. Serpina1 is a potent inhibitor of IL-8-induced hematopoietic stem cell mobilization. **Proc Natl Acad Sci**, vol. 103, n. 5, p.1469-1474, Jan. 2006.

VANDYKE, K.; FITTER, S.; DEWAR, A. L.; HUGHES, T.P.; ZANNETTINO, A. C. W. Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate. **Blood**, vol. 115, n. 4, p. 766-774, Jan. 2010.

VIGORITO, A. C.; CÁRMINO, A.,S. Hematopoietic stem cell transplant and recovery of hematopoiesis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31(4):280-284

ZHANG, C.; ZHANG, X.; CHEN, X.H. Granulocyte-colony stimulating factor mobilized mesenchymal stem cells: A new resource for rapid engraftment in hematopoietic stem cell transplantation. **Medical Hypotheses**, vol. 76, n. 2, p. 241-243, Feb. 2011.



ZHU, J.; GARRETT, R.; JUNG, Y. et al. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. **Blood**, vol. 109, n. 9, p. 3706-3712, Jan. 2007.

ZIMMERMANN TM, LEE WJ, BENDER JG, et al: Quantitative CD34 analysis may be used to guide peripheral blood stem cell harvest. **Bone Marrow Transplant**, vol. 15, n. 3, p. 439-444, Mar. 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Instrumento de Coleta de Dados

APÊNDICE A – Instrumento de Coleta de Dados

	INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	
<p>Referente ao projeto de pesquisa: QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR CD34+ POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PACIENTES EM MOBILIZAÇÃO E A CORRELAÇÃO COM A LEUCOMETRIA.</p> <p>Pesquisadores: Patricia Elkiki dos Santos / Dr. Abrahão Elias Hallack</p>		
DADOS CLÍNICOS DO PACIENTE		
<p>Nome do paciente: _____</p> <p>Sexo: () M () F DN: ___/___/_____ Idade: ___ anos Peso: _____ kg</p> <p>Centro Transplantador: () Hospital Universitário – UFJF () Hospital Monte Sinai</p> <p>Médico responsável: _____</p> <p>Diagnóstico principal:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. () Linfoma de Hodgkin 2. () Linfoma não-Hodgkin 3. () Mieloma Múltiplo 4. () Outros: _____ <p>Se Linfoma, há acometimento da MO? () Sim () Não</p> <p>Status da doença na mobilização:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. () Remissão Completa 2. () Remissão Parcial 3. () Refratário <p>FATORES INTERFERENTES</p> <p>- Protocolo quimioterápico? _____</p> <p style="padding-left: 40px;">Número de ciclos: _____</p> <p>- Realizou radioterapia? () Sim () Não</p> <p>- Paciente já transplantado? () Sim () Não Se sim, quando? _____</p> <p>- Tipo de mobilização? _____</p> <p>- Dose de filgrastim? _____ Quantidade? _____ Quantos dias? _____</p> <p>- Número de coletas? _____ Número de volemias? _____</p> <p>- Uso de heparina na coleta? () Sim () Não Se sim, qual quantidade? _____</p> <p>- Tempo de neutropenia? _____ Dia da pega medular? _____</p>		

DADOS LABORATORIAIS DO PACIENTE				
HEMOGRAMA E CITOMETRIA				
Data: ___/___/___				
Leucometria: _____	Linfócitos: _____	Monócitos: _____	Neutrófilos: _____	
Plaquetas _____ uL	%CD34+: _____	CD34+/uL: _____	Hb: _____	
Data: ___/___/___				
Leucometria: _____	Linfócitos: _____	Monócitos: _____	Neutrófilos: _____	
Plaquetas _____ uL	%CD34+: _____	CD34+/uL: _____	Hb: _____	
Data: ___/___/___				
Leucometria: _____	Linfócitos: _____	Monócitos: _____	Neutrófilos: _____	
Plaquetas _____ uL	%CD34+: _____	CD34+/uL: _____	Hb: _____	
Data: ___/___/___				
Leucometria: _____	Linfócitos: _____	Monócitos: _____	Neutrófilos: _____	
Plaquetas _____ uL	%CD34+: _____	CD34+/uL: _____	Hb: _____	
Data: ___/___/___				
Leucometria: _____	Linfócitos: _____	Monócitos: _____	Neutrófilos: _____	
Plaquetas _____ uL	%CD34+: _____	CD34+/uL: _____	Hb: _____	
INFORMAÇÕES CLÍNICAS RELEVANTES				

_____ Responsável pelo levantamento dos dados			DATA ___/___/___	

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética pela Plataforma Brasil


ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido


ANEXO C – Comprovante de Submissão do Artigo

ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética pela Plataforma Brasil

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA





Título da Pesquisa: QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR CD34+ POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PACIENTES EM MOBILIZAÇÃO E A CORRELAÇÃO COM A LEUCOMETRIA
 Pesquisador Responsável: Patricia Elkiki dos Santos
 Área Temática:
 Versão: 1
 CAAE: 53105615.9.0000.5133
 Submetido em: 05/02/2016
 Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_564036

+ DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO

Apreciação ↕	Pesquisador Responsável ↕	Versão ↕	Submissão ↕	Modificação ↕	Situação ↕	Exclusiva do Centro Coord. ↕	Ações
PO	Patricia Elkiki dos Santos	1	05/02/2016	23/02/2016	Aprovado	Não	   

+ HISTÓRICO DE TRÂMITES

LEGENDA:

(*) Apreciação

PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante
E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante	Nc = Notificação de Centro Coparticipante

(*) Formação do CAAE

ANEXO B**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HU/UFJF
JUIZ DE FORA – MG – BRASIL

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Pesquisador Responsável: Patricia Elkiki dos Santos

Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Martelos

CEP: 36036-330 – Juiz de Fora – MG

Fone: (32) 2102-6320

E-mail: patricia.elkiki@ufjf.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR CD34+ POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PACIENTES EM MOBILIZAÇÃO E A CORRELAÇÃO COM A LEUCOMETRIA”**. Neste estudo pretendemos verificar os fatores relacionados ao paciente, além de definir o melhor momento para o início da quantificação de CD34 possibilitando uma coleta mais eficaz de células mononucleares e pico de CD34, otimizando o processo de coleta buscando benefícios para o paciente e redução de custo e tempo para o serviço.

O motivo que nos leva a realizar esta pesquisa é a necessidade de definir o melhor momento para o início da quantificação de CD34 possibilitando uma coleta mais eficaz, com um maior aproveitamento celular, o que irá diminuir o tempo de espera para realização de coletas e beneficiar o paciente.

Para este estudo será coletado 4ml de sangue em um tubo de EDTA por dia, após a mobilização das células-tronco hematopoéticas. Essa amostra será encaminhada ao laboratório IMUNOCET da UFJF para quantificação de CD34+, até que atinja o número mínimo de células para a realização da coleta para posterior transplante de medula óssea.

A pesquisa possui riscos mínimos, como por exemplo a perda de dados, que será controlada por meio do instrumento de coleta de dados e aqueles riscos inerentes ao tratamento, não relacionados diretamente a pesquisa, hematoma para coleta de sangue, dor no local da punção.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação no seu tratamento.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O(A) Sr(a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET) na Universidade Federal de Juiz de Fora e a outra será fornecida a você.

Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo **“QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR CD34+ POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PACIENTES EM MOBILIZAÇÃO E A CORRELAÇÃO COM A LEUCOMETRIA”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20____.

Nome	Assinatura do participante	DATA
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do participante	DATA
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do participante	DATA
------	----------------------------	------

<p>Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF Hospital universitário Unidade Santa Catarina Prédio da Administração Sala 27. CEP 36036-110</p>
--

ANEXO C Comprovante de submissão do Artigo**The importance of quantification of CD34 in the mobilization of hematopoietic progenitor cells**

Patricia Elkiki dos Santos, Mariza Aparecida Mota, Luciano José Megale Costa, Luiz Cláudio Ribeiro, Valesca Nunes dos Reis, Rodrigo de Oliveira Andrade, Abrahão Elias Hallack Neto

Archives of Medical Research

Dear Patricia,

Your submission entitled "The importance of quantification of CD34 in the mobilization of hematopoietic progenitor cells" has been assigned the following manuscript number: ARCMED-D-18-00101.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/arcmed/>.

Your username is: patricia.elkiki@gmail.com

If you need to retrieve password details

please go to: http://ees.elsevier.com/arcmed/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Oscar R. Fuentes-Porragas, B.S.

Editorial Office