 ISSN 0871-3413 • ©*ArquiMed*, 2006

Colheita de Células Progenitoras Hematopoiéticas Periféricas em Doentes Pediátricos

Marika Bini-Antunes*; Susana Roncon*; Fernando Campilho†; Isabel Barbosa*; Helena Leal*; Alcina Ávila*; Sara Ferreira*; António Campos†; Carlos Pinho Vaz†; Rosa Branca Ferreira†; Pedro Pimentel†; Lucília Norton‡; Alzira Carvalhais*

*Serviços de *Imuno-Hemoterapia, †Transplantação de Medula Óssea e ‡Pediatria, Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Centro Regional do Porto, Porto.*

A evolução das técnicas de aférese tem permitido a colheita de células progenitoras hematopoiéticas periféricas (CPHP) em crianças candidatas a autotransplante.

Neste trabalho analisamos retrospectivamente 71 crianças (37 de sexo masculino e 34 de sexo feminino) propostas para autotransplante no IPO-Porto entre Dezembro 1995 e Setembro 2005.

Os doentes tinham uma mediana de 10 anos de idade e um peso mediano de 29 kg. Apresentavam os seguintes diagnósticos: neuroblastoma 20, doença de Hodgkin 13, leucemia mielóide aguda 9, leucemia linfoblastica aguda 8, linfoma não Hodgkin 6, sarcoma de Ewing 5, outros diagnósticos 10.

Todos os doentes foram tratados com quimioterapia antes da primeira mobilização (mediana de 2 protocolos) e em 9 deles também foi efectuada radioterapia.

As crianças foram mobilizadas com G-CSF com uma dose diária mediana de 11,1 μg/kg (mínimo 5-máximo 20) na primeira mobilização e 18.1 μg/kg (mínimo 6, máximo 25-21) na segunda mobilização.

Iniciamos as colheitas ao 5º dia de mobilização e uma hora após a injecção de G-CSF. Foram realizadas, no máximo, três aféreses por mobilização.

Em 22 crianças (28,2%) foi necessária uma segunda mobilização e em 4 (5,6%) uma terceira para atingir uma dose alvo de $2x10^6$/kg células CD34+.

Foi efectuado *priming* com eritrócitos em 32 doentes (45%). Em cada aférese foram processadas uma mediana de 4 volemias, sendo o tempo mediano de duração de cada procedimento de 141 minutos. A mediana do débito sanguíneo mantido foi de 59 ml/min.

Uma mediana de $0,94x10^6$/kg e $0,80x10^6$/kg células CD34+ foi colhida por aférese, na primeira e na segunda mobilização, respectivamente.

Encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre o número de células CD34+ no sangue periférico pré-aférese e na colheita (coeficiente de Pearson 0,834, $p<0,01$)

Observamos uma correlação significativa entre a contagem plaquetária e de leucócitos pré-aférese e a percentagem de células CD34+ no enxerto (Kruskal Wallis, $p<0,01$).

Não encontramos uma correlação significativa entre o número de protocolos de quimioterapia efectuados antes da 1ª mobilização e o número de células CD34+ colhidas. Da mesma forma, não houve nenhuma correlação entre a radioterapia antes da 1ª mobilização e o número de progenitores colhidos.

Em conclusão a colheita de células progenitoras hematopoiéticas periféricas nos doentes pediátricos é um procedimento seguro e algumas determinações analíticas pré-aférese, nomeadamente a contagem de células CD34+, de plaquetas e leucócitos constituem bons indicadores da eficácia da colheita.

Palavras-chave: progenitores hematopoiéticos; aférese; crianças; transplante autólogo.

ARQUIVOS DE MEDICINA, 20(1-2): 25-29

INTRODUÇÃO

O transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas periféricas é uma opção terapêutica em crianças com neoplasias hematológicas ou tumores sólidos (1, 2).

Neoplasias como linfomas refractários ou recorrentes, neuroblastoma no estadio IV, retinoblastoma com envolvimento extraocular ou sarcoma de Ewing requerem quimioterapia de alta dose com a finalidade de consolidar o tratamento e a infusão de células progenitoras hematopoiéticas periféricas neste contexto permite minimizar os riscos relacionados com períodos de pancitopenia prolongada (1-4).

A utilização de células progenitoras hematopoiéticas periféricas como fonte para o autotransplante apresenta vantagens comprovadas em relação à medula óssea, pois o procedimento de colheita é menos invasivo e a

reconstituição da hematopoiese e da resposta imune é mais rápida (2,5,6,7).

Contudo, a colheita por aférese apresenta riscos nos doentes pediátricos (1,5,11), nomeadamente o volume extracorporal de cerca de 280 ml do equipamento, que torna necessário a realização de um *priming* com concentrado de eritrócitos nas crianças de baixo peso e baixas volemias.

As crianças apresentam, ainda, vasos de pequeno calibre o que implica a colocação de um catéter venoso central (CVC) para efectuar as colheitas (1,5).

Podem ocorrer distúrbios metabólicos (hipocalcemia, hipoglicemia) principalmente relacionados com a toxicidade induzida pelo citrato infundido no sistema (1,5), alterações hemodinámicas transitórias (hipotensão, hipotermia) e toxicidade hematológica (diminuição da hemoglobina e da contagem plaquetária) (8).

Torna-se portanto importante optimizar a colheita de células progenitoras hematopoiéticas periféricas minimizando o número de leucaféreses por doente (9).

A realização de leucaféreses de grande volume, definida como o processamento de mais de 3 volemias de sangue total numa única sessão, poderá permitir a obtenção da dose alvo de células progenitoras hematopoiéticas periféricas com um menor número de colheitas (10-13).

A contagem de células CD34+ no sangue periférico antes do início da aférese é um indicador da eficácia da colheita e o início e a duração de cada procedimento poderão ser programados com base neste resultado preliminar (7).

Neste trabalho realizamos uma análise retrospectiva dos doentes pediátricos propostos para transplante autólogo no IPO-Porto entre Dezembro 1995 e Setembro 2005 e avaliamos as possíveis variáveis que afectam a colheita de células progenitoras hematopoiéticas periféricas.

MÉTODOS

Características da população estudada

Analisámos retrospectivamente 71 crianças propostas para autotransplante (n=54) ou colheita de reserva (n=17) entre 1995 e Setembro 2005 (Tabela 1).

O grupo incluía 37 crianças de sexo masculino e 34 crianças de sexo feminino com os seguintes diagnósticos: neuroblastoma 20 doentes (28,2%), doença de Hodgkin 13 doentes (18,3%), leucemia mielóide aguda (LMA) 9 doentes (12,7%), leucemia linfoblastica aguda (LLA) 8 doentes (11,3%), linfoma não Hodgkin (LNH) 6 doentes (8,5%), sarcoma de Ewing 5 doentes (7,0%), outros diagnósticos 10 doentes (14,1%).

A idade mediana na altura da colheita de células progenitoras hematopoiéticas periféricas foi de 10 anos (mínimo 2 - máximo16) e o peso mediano de 29 kg (mínimo 10 - máximo 72). Todos os doentes tinham efectuado pelo menos um protocolo de quimioterapia antes da primeira mobilização (mediana de 2 protocolos, intervalo 2-5) e em 9 doentes (12,7%) foi realizada radioterapia (Tabela 1).

Mobilização

Os doentes foram mobilizados com G-CSF, administrado por via subcutânea ou intravenosa, em dose diária única ou dividida em duas tomas, com início das colheitas ao 5º dia de mobilização e uma hora após a injecção de G-CSF. Foram realizadas, no máximo, três aféreses por mobilização.

Acesso vascular

Em todos os doentes foi introduzido um catéter venoso central de duas vias, para a realização das colheitas.

Colheita

Foi utilizado o separador celular de fluxo contínuo COBE SPECTRA em 69/71 doentes (apenas em 2 doentes, que efectuaram a colheita em 1995, foi utilizado o separador celular CS 3000 plus).

A anticoagulação foi efectuada com ACD-A em associação com heparina standard (5000 UI por cada 500 ml de citrato). A razão sangue/anticoagulante mantida durante o procedimento foi de 25:1.

Atendendo a que a volemia extracorporal do

Tabela 1 - **Características da população estudada.**

	Mediana (mínimo-máximo)	**Nº doentes**	**% doentes**
Idade (anos)	10 (2-16)		
Sexo (Masculino/Feminino)		37/34	52,1/47,9
Peso (Kg)	29 (10-72)		
Linhas quimioterapia prévias à 1ª mobilização	2 (1-5)		
Radioterapia prévia à 1ª mobilização (sim/não)		9/62	12,7/87,3

equipamento é de 280 ml, foi definido como *cut off* para a realização de *priming* com concentrados eritrocitários uma volemia do doente <2800 ml, o que corresponde aproximadamente a um peso de 30 kg. Foi efectuado o ajuste do hematócrito da unidade utilizada ao hematócrito da criança mediante diluição com soro fisiológico 0,9%.

Foram processadas entre 1 e 4 volemias por aférese, com ajuste visual da cor da colheita.

No final do procedimento manteve-se a isovolemia do doente. A monitorização da colheita incluiu a determinação dos valores tensionais e da frequência cardíaca no início, durante e no final do procedimento.

Não foi efectuada administração profilatica de gluconato de cálcio mas apenas em caso de aparecimento de sintomas ou sinais relacionados com hipocalcemia.

A reversão dos sinais e sintomas relacionados com o citrato foi feita com administração endovenosa de gluconato de cálcio 10%, na dose de 0,2 ml/kg.

Avaliação analítica

A avaliação analítica do doente incluiu: hemograma e ionograma pré- e pós-citaférese e contagem de células CD34+ antes de cada aférese. Foi ponderada a terapêutica transfusional após a colheita quando a contagem plaquetária apresentava-se <50x10^9/L e/ou a hemoglobina <7gr/dl.

A contagem de células nucleadas no enxerto foi efectuada mediante contador automático e a percentagem de células CD34+ determinada por citometria de fluxo mediante dupla marcação com anticorpos monoclonais CD34+ e CD45+. O número absoluto de células CD34+ foi calculado multiplicando o número de células nucleadas no produto da aférese com a percentagem de células CD34+ .

Foi definido o número mínimo de células CD 34+ para autotransplante de 2x10^6/kg.

Análise estatística

Os dados relativos aos doentes foram armazenados com recurso ao *software* Access do Windows XP.

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* SPSS.

Foram utilizados testes estatísticos não parametricos para comparar resultados entre grupos (χ^2, Kruskal Wallis) e uma regressão linear para relacionar as contagens de células CD34+ sangue periférico e no produto da aférese.

Foram considerados significativos valores de p<0,05 e muito significativos valores de p<0,01.

RESULTADOS

Entre 1995 e Setembro 2005 realizaram-se 186 procedimentos de aférese em 71 crianças.

Em 20 crianças (28,2%) foi necessária uma segunda mobilização e em 4 crianças (5,6%) uma terceira mobilização para atingir a dose alvo de células CD34+ para o transplante.

A dose diária mediana de G-CSF administrada na primeira mobilização foi de 11,1μg/Kg (mínimo 5 - máximo 20) e na segunda mobilização de 18,1 μg/kg (mínimo 6,2 -máximo 21).

Foi efectuado o priming com uma unidade de glóbulos rubros em 65 procedimentos (32/71 crianças).

A mediana de células CD34+x10^6/Kg foi de 1,6, 0,9 e 0,45x10^6/Kg, respectivamente no 1º, 2º e 3º dia de colheita da primeira mobilização e de 1,17, 0,72 e 0,44, respectivamente no 1º, 2º e 3º dia de colheita da segunda mobilização (Tabela 2).

Em cada aférese foram processadas uma mediana de 4 volemias, sendo de 141 minutos o tempo mediano de duração de cada procedimento. A mediana do débito sanguíneo foi de 59 ml/min.

Registamos 46 complicações num total de 186 procedimentos realizados, nomeadamente: 20 episódios de parestesias relacionadas com o citrato infundido no sistema, 23 complicações por mau funcionamento do cateter, com necessidade de interrupção da colheita em 9 casos, 2 episódios de vómito e 1 episódio de hipotensão.

Relativamente às necessidades transfusionais, apenas um doente necessitou de transfusão com plaquetas e eritrócitos após o término da aférese no segundo dia de colheita. Um doente fez transfusão de eritrócitos antes de iniciar o procedimento.

Tabela 2 - **Mediana de células CD34+ (x10^6/kg) colhidas em cada dia de aférese na primeira e na segunda mobilização.**

	Aférese dia 1 mediana (mínimo-máximo)	**Aférese dia 2** mediana (mínimo-máximo)	**Aférese dia 3** mediana (mínimo-máximo)
1ª mobilização	1,60 (0,03-25,80)	0,90 (0,07-3,80)	0,45 (0,05-2,40)
2ª mobilização	1,17 (0,10-5,50)	0,72 (0,2-1,00)	0,44 (0,14-0,90)

Encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre o número de células CD34+ no sangue periférico pré-aférese e na colheita (coeficiente de Pearson 0,834, p<0,.01) (Figura1).

Os doentes foram divididos em 3 grupos com base na contagem de células CD34+ no sangue periférico: <10/μl, 10-20/μl e > 20/μl. Como mostrado na Tabela 3, observamos diferenças estatisticamente significativas no número de células CD34+ colhidas nos 3 grupos (χ^2, p<0,01).

Encontramos, ainda, uma relação estatisticamente significativa entre a contagem plaquetária pré-aférese e o número de células CD34+ colhidas (Kruskal Wallis test,

p<0,01). Em particular, a mediana de células CD34+ na colheita foi de 0,5, 0,96 e 1,18x10^6/kg nos doentes que apresentavam plaquetas pré-aférese, respectivamente, <100x, 100-150, >150x10^9/l.

Observamos uma relação significativa entre a

Tabela 3 - **Mediana de células CD34+ colhidas em relação ao valor de CD34+ no sangue periférico pré-aférese (χ^2, p<0,01).**

CD34+(x10^6/kg) na aférese	CD34+/µl no SP			Total
	<10	10-20	>20	
<1	66	12	2	80
>1	15	21	25	61
Total	81	33	27	141

SP - sangue periférico

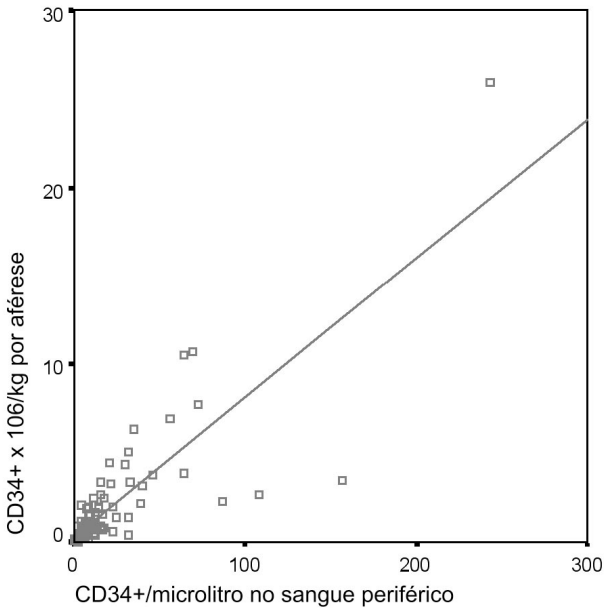


Fig. 1 - Correlação entre número de células CD34+ no sangue periférico (microlitro) e no produto de aférese (x10^6/kg) (Linear regression, Pearson 0.834).

contagem de glóbulos brancos (GB) pré-aférese e o número mediano de células progenitoras colhidas: 0,43x10^6/kg se GB <10x10^9/l, 0,87x10^6/kg se GB entre 10-20x10^9/l, 1,39x10^6/kg se GB entre 20-40x10^9/l e 1,69x10^6/kg nos doentes com GB >40x10^9/l (Kruskal Wallis test, p<0,01) (Figura 2).

Não encontramos uma correlação significativa entre o

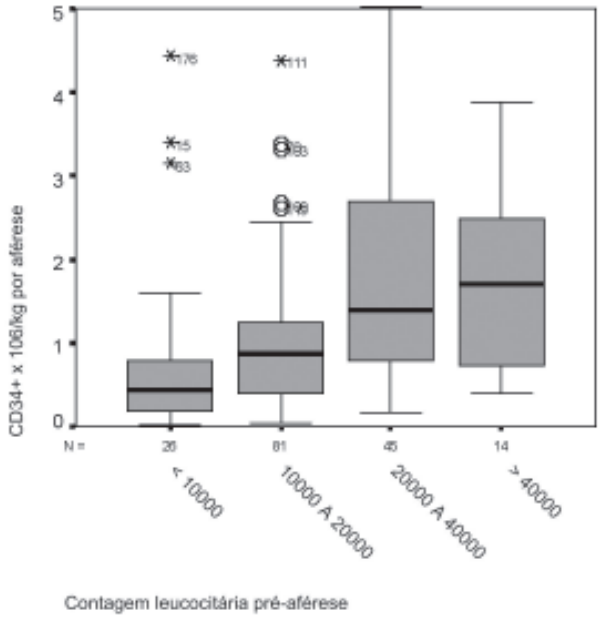


Fig. 2 - Associação entre contagem de globulos brancos no sangue periférico antes da colheita (microlitro) e número de células CD34+ no produto de aférese (x10^6kg) (Kruskal Wallis, p<0,01).

número de protocolos de quimioterapia efectuadas antes da 1ª mobilização e o número de células CD34+ colhidas. Da mesma forma não houve nenhuma correlação entre radioterapia antes da 1ª mobilização e o número de progenitores colhidos.

DISCUSSÃO

Conforme já descrito por vários autores (1,3,4), a colheita de células progenitoras hematopoiéticas periféricas pode ser realizada com segurança nos doentes pediátricos.

A realização do *priming* com eritrócitos permitiu prevenir a hipovolemia e não se observaram complicações major.

O mau funcionamento do catéter foi a complicação mais frequente com necessidade de interrupção da colheita em 9 casos.

As parestesias secundárias a hipocalcemia reverteram sempre após a administração de gluconato de cálcio.

Como a leucaférese é um procedimento de elevado custo, moroso e com vários problemas técnicos associados, especialmente nos doentes pediátricos (7), tentamos definir parâmetros de ordem clínica e analítica que nos pudessem orientar no sentido de minimizar o número e a duração das aféreses.

Observamos que em 20 crianças (28,2%) foi

necessária uma segunda mobilização e em 4 crianças (5,6%) uma terceira mobilização para atingir a dose alvo de células CD34 + para o transplante. As quimioterapias previamente realizadas, a dose e o tipo de administração do G-CSF e o próprio estado da doença poderão ter influido no baixo número de progenitores colhidos nestes casos.

Alguns autores (7) observaram que a duração da quimioterapia prévia influencia negativamente a concentração de células CD34+ no enxerto. Nos doentes estudados, não encontramos relação entre radioterapia e número de protocolos de quimioterapia efectuados e o número de células CD34+ colhidas, provavelmente porque a casuística de doentes que tinham efectuado radioterapia era pequena (9 doentes) e a maioria das crianças tinha realizado dois protocolos de quimioterapia antes da primeira mobilização. Sendo assim, não foi possível valorizar as diferenças entre os diferentes grupos. Teria sido necessário um número maior e, talvez, mais heterogéneo de doentes para comprovar o efeito negativo da quimio e radioterapia.

Do ponto de vista analítico, encontramos uma correlação significativa entre o número de células CD34+ no sangue periférico pré-aférese e o número de células CD34+ no enxerto.

Observamos que nos 66/81 casos em que havia uma contagem no sangue periférico <10/μl, o número de células CD34+ no enxerto foi <1x10^6/kg. Apenas 2/27 casos com contagem no sangue periférico >20/μl colheram <1x10^6/kg células CD34+.

Apesar das diferenças supramencionadas resultarem estatisticamente significativas, em 15 doentes com contagem no sangue periférico <10/μl houve uma colheita de células CD34+ >1x10^6/kg. Concluímos assim que, mesmo havendo uma correlação entre contagem de células CD34+ no sangue periférico e no enxerto, não nos podemos basear exclusivamente neste parâmetro para decidir o início da colheita.

As contagens de leucócitos e plaquetas pré-aférese estão significativamente relacionadas com o número de progenitores colhidos pois valores de leucócitos >10x10^9/L e de plaquetas >150x10^9/L estão associados à colheitas com contagens de células CD34+ > 1x10^6/Kg.

O conjunto de determinações analíticas pré-aférese deverão então ser cuidadosamente avaliados antes de proceder à colheita.

A dose e o tipo de administração de G-CSF, que neste estudo não foram relacionados com a eficácia da colheita, deverão, porém, ser considerados numa análise futura.

Por fim, uma casuística maior e dados clínicos adicionais são necessários para reavaliar os efeitos da quimioterapia e radioterapia sobre a colheita de células progenitoras hematopoiéticas periféricas.

REFERÊNCIAS

1 - D Orbach, S Hojjat-Assari, F Doz, et al. Peripheral blood stem cell collection in 24 low weight infants: experience of a single centre. Bone Marrow Tranplant 2003;31:171-4.

2 - Cecyn KZ, Seber A, Ginani UC, et al. Large volume leukapheresis for peripheral blood progenitor cell collection in low body weight pediatric patients. A single centre experience.Transfus Apher Sci 2005 Jun; 32(3): 269-274.

3 - Grupp SA, Stern JW, Bunin N, et al.Tandem High dose therapy in rapid sequence for children with high risk neuroblastoma.J Clin Oncol 2000;18: 2567-75.

4 - Koristek Z, Sterba J, Havranova D, Mayer J. Technique for PBSC harvesting in children of weight under 10 Kg. Bone Marrow Transplant 2002;29: 57-61.

5- Marson P, Petris MG, de Silvestro G. Collection of peripheral blood stem cells in paediatric patients: a concise review on technical aspects. Bone Marrow Transplant 1998; 22 Suppl. 5:S7-S11.

6- Sevilla J, González-Vicent M, Madero L, Garcia-Sánchez F, Díaz MA. Granulocyte colony-stimulating factor alone at 12 ug/Kg twice a day for 4 days for peripheral blood progenitor cell priming in pediatric patients. Bone Marrow Transplant 2002;30:417-20.

7 - Diaz MA, Alegre A, Villa M, et al. Pediatric experience with autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: influence of CD 34+ cell dose in engraftment kinetics. Bone Marrow transplant 1996;18:699-703.

8 - Diaz MA, Kanold J, Vicent MG, Halle P, Madero L, De-meocq F. Using peripheral blood progenitor cells (PBPC) for transplantation in pediatric patients: a state of the art review. Bone Marrow Transplant 2000;26:1291-8.

9 - Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Lillo R, Vicent MG, Vicario JL, Madero L. Large volume leukapheresis in pediatric patients: pré-apheresis peripheral blood CD34+ cell count predicts progenitor cell yield. Haematologica 1999;84:32-5.

10- Sevilla J, Gonzalez-Vicent M, Madero L, Garcia-Sanchez F, Diaz MA. Large volume leukapheresis in small children: safety profile and variables affecting peripheral blood progenitor cell collection. Bone Marrow Transplant 2003;31: 263-7.

11 - Delgado J, Fernandez-Jimenez MC, Martinez A, et al. Analysis of factors affecting PBPC collection in low-weight children with malignant disorders. Cytotherapy 2004;6:43-9.

12 - Torrabadella M, Olive T, Ortega JJ, Massuet L. Enhanced HPC recruitment in children using LVL and a new automated apheresis system. Transfusion 2000;40:404-10.

13 - Cassens U, Barth IM, Baumann C, et al. Factors affecting the efficacy of peripheral blood progenitor cells collections by large volume leukaphereses with standardized processing volumes. Transfusion 2004;44:1593-602.

Correspondência:

Dr.ª Marika Antunes
Departamento de Imuno-Hemoterapia
Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil
Centro Regional do Porto
Rua Dr. António Bernardino de Almeida
4200-072 Porto

e-mail: marika.bini@email.it