ACADEMIA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

COLETA DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS DE SANGUE PERIFÉRICO

ANDRÉ WESLEI MONTINI

Curso de Pós Graduação:
Hematologia e Banco de Sangue

2011

Resumo

Atualmente o transplante de células progenitoras hematopoéticas está sendo amplamente utilizado, resultando em bons tratamentos para diversas patologias. Uma maneira que se tem mostrado eficiente para se obter essas células é a coleta de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico através da Leucaférese, que consiste em coletar o sangue total, separar os componentes sanguíneos obtendo assim o produto adequado para o transplante. Para uma boa coleta é necessário uma prévia mobilização que consiste em recrutar as células da medula óssea para o sangue periférico permitindo assim com que essas sejam coletadas. Estudos tem demonstrado que o transplante resultante de células obtidas através do sangue periférico resultam em um número adequado de células para o transplante e uma melhor recuperação hematopoética.

Palavras-chave: células progenitoras hematopoéticas; mobilização; sangue periférico; transplante.

Introdução

As células progenitoras hematopoéticas da medula óssea possui uma alta capacidade de diferenciação e auto-renovação, podendo dar origem a várias linhagens de células sanguíneas. Portanto, atualmente, o transplante de células progenitoras hematopoéticas é amplamente utilizado para o tratamento de diversas doenças hematológicas, oncológicas, hereditárias e imunológicas. Essas células progenitoras podem ser provenientes da medula óssea, do cordão umbilical e também do sangue periférico.

Ultimamente o transplante de células progenitoras hematopoéticas obtidos através do sangue periférico está sendo usado em larga escala, visto que vários fatores estão ligados ao sucesso desse transplante. O número de células progenitoras na circulação periférica é muito baixo, portando é necessário fazer uma mobilização dessas células, aumentando assim sua quantidade para que elas sejam coletadas do sangue periférico através do procedimento de aféreses, mais precisamente Leucaférese, que consiste em separar as células sanguíneas coletando a camada de células mononucleares do sangue periférico e devolvendo o restante ao doador através de um separador de células automático.

Esse trabalho tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre a coleta e transplante de células progenitoras hematopoéticas periféricas obtidas através de leucaférese, mostrando sua importância e suas vantagens.

Células Progenitoras Hematopoéticas

As células progenitoras hematopoéticas (CPH) são células que possuem poder de auto-renovação e também capacidade de diferenciação em várias linhagens sanguíneas. Dentro da terapia celular, o transplante de CPH é a modalidade que se tem obtido mais eficácia no tratamento de doenças

malignas e não malignas. As doenças neoplásicas tem a maior indicação desse tipo de terapia sendo responsável por 95% do total das indicações.

A caracterização das CPH tem sido realizada através da expressão do antígeno de membrana CD34 que se trata de uma fosfoglicoproteína transmembrana com cerca de 110 kDa, que são encontradas em células hematopoéticas imaturas, em algumas células endoteliais maduras e células do estroma, onde nem todas suas funções ainda foram definidas. Anticorpos monoclonais contra CD34 foram bem desenvolvidos e são utilizados em citometria de fluxo para determinar a quantidade de células CD34+ no sangue periférico e também no produto após a coleta das células progenitoras.

O transplante de células progenitoras hematopoéticas pode ser classificado como autólogo (realizado com as células do próprio receptor), alogênico (as células usadas no transplante são coletadas de um doador que possua compatibilidade com os antígenos leucocitários – HLA do paciente) e singênico (as células transplantadas são de um irmão gêmeo univitelino, geneticamente idênticas).

Fonte Para Coleta de Células Progenitoras Hematopoéticas

As CPH podem ser obtidas a partir da medula óssea, do cordão umbilical ou do sangue periférico. A finalidade é se obter uma quantidade de células suficiente para uma “pega medular” resultando assim em uma recuperação rápida, completa e sustentada após o enxerto.

A medula óssea é a fonte mais tradicional para obtenção de CPH, onde as células são obtidas através de punções de locais hematopoéticamentes ativos e acessíveis do esqueleto, como crista ilíaca, dentro do centro cirúrgico com o uso de anestesias. Porém essa técnica está sendo substituída pela coleta de CPH de sangue periférico, visto que alguns fatores podem diminuir o sucesso do enxerto como: presença de infiltração e fibrose medular,

contaminação através de células neoplásicas, radioterapia prévia, obesidade e alto risco para anestesia.

As CPH do cordão umbilical são provenientes do sangue circulante do feto, que permanece na placenta e nos vasos umbilicais logo no pós-parto. Geralmente seu uso é restrito para pacientes pediátricos devido ao baixo volume de coleta e consequentemente o baixo número de células precursoras. As CPH de cordão umbilical possui uma maior capacidade de auto-renovação e proliferação e uma menor frequência da doença do enxerto *versus* hospedeiro, porém possui uma recuperação hematológica mais lenta.

Em condições normais o número de CPH no sangue periférico é muito pequeno, pois essas células em quase sua totalidade estão alojadas na medula óssea. Portanto para que uma coleta garanta uma boa enxertia em transplantes autólogos ou alogênicos é necessário um incremento dessas células no sangue periférico, isso é realizada através da mobilização das células da medula óssea para a circulação, através da administração de agentes quimioterápicos mielossupressores e fatores de crescimento hematopoéticos.

Mobilização de Células Progenitoras Hematopoéticas

Como sabemos que em quase sua totalidade as CPH residem na medula óssea, uma pequena quantidade dessas células estão circulantes no sangue periférico, cerca de 1 a 5 células/mm³. Sendo assim, uma coleta por aférese dessas células em condições basais se tornaria inviável, pois necessitaria de aproximadamente 20 procedimentos para obter uma quantidade adequada de células para promover uma enxertia, tornando esse processo longo, exaustivo e caro.

Os mecanismos de recrutamento dessas células do compartimento medular para a circulação através de estímulos são denominados mobilização. Essa mobilização pode ser realizada por meio de administração isolada de

agentes quimioterápicos mielossupressores, fatores de crescimento hematopoéticos ou o uso concomitante dos dois agentes. O recrutamento dessas células se dá pelo estresse induzido pela quimioterapia e por estímulos constantes dos fatores de crescimento, porém ainda não se tem um bom entendimento de como essas células migram do compartimento medular para a circulação, sendo assim, ainda não possui protocolos de mobilização eficientes, principalmente para pacientes poucos mobilizadores.

A estratégia de mobilização de CPH para coleta através do sangue periférico depende do resultado que se deseja obter, transplante autólogo ou alogênico. Para transplante autólogo a mobilização que se mostra mais efetiva é a administração de agentes quimioterápicos mielossupressores associados a fatores de crescimento hematopoéticos, em contrapartida, para transplante alogênico a mobilização de escolha é o uso isolado de fatores de crescimento hematopoéticos.

O fator de crescimento hematopoético amplamente utilizado é fator humano estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), pois apresenta uma maior eficiência e uma menor toxicidade. Outro fator de crescimento, como o fator humano estimulador de colônias de granulócitos e de monócitos (GM-CSF) também pode ser utilizado, porém seu uso é menor, pois possivelmente apresenta maior incidência de efeitos colaterais, custos elevados e menor capacidade de rendimento de células CD34+.

Outros fatores estimulantes também tem demostrado capacidade de recrutamento de CD34+ como a Eritropoetina (Epo) utilizada como suporte para manter níveis elevados de hemoglobina em pacientes em quimioterapia. O fator de *stem cell* aparece como um agente alternativo mobilizador principalmente quando associado com o G-CSF, no entanto, a alta frequência de reações alérgicas dificulta seu uso na prática. Novos fatores estimulantes estão sendo estudados como a *Pegfilgrastina* (variante de longa duração do G-CSF), a *Darbopoetina (*eritropoietina) e também a AMD3100 (AnorMed, Vancouver, Canada).

O uso de quimioterápicos mielossupressores foi a primeira estratégia descrita para a mobilização de CPH, onde no momento da recuperação medular foi observada um aumento das células progenitoras hematopoéticas circulantes no sangue periférico. O quimioterápico mais utilizado ultimamente é a ciclofosfamida sendo combinado com outras drogas ou não.

O mecanismo causado pelo quimioterápico é uma mielossupressão transitória e profunda ocasionando uma leucopenia profunda entre o 7º e o 14º dia após a administração. Após esse momento há um aumento da leucometria e consequentemente aumento das células progenitoras no sangue periférico. O uso de fatores estimulantes hematopoéticos pode ser administrado logo em seguida ao término da quimioterapia ou de 5 a 7 dias após o término do ciclo, e esse deverá ser mantido até o último dia da coleta. No momento adequado para a coleta das células, deve-se considerar um intervalo de 6 horas entre a aplicação do fator e o início da leucaférese.

Em doadores alogênicos a mobilização é exclusivamente feita através de fatores de crescimento hematopoéticos, onde o G-CSF é administrado em via subcutânea, uma ou duas vezes ao dia, onde o pico máximo de células precursoras costuma ocorrer no quinto dia. Após o pico de células, independentemente da administração de fatores estimulantes, as células CD34+ circulantes entram em declínio.

Após a mobilização de células CD34+ para o sangue periférico o próximo passo é iniciar o procedimento de coleta dessas células, porém para saber se houve uma boa mobilização e consequentemente se haverá uma coleta suficiente para uma enxertia é necessário tomar conhecimento de alguns critérios.

Critérios para o início da Leucaférese

Os critérios para o início da Leucaférese ainda podem ser divididos em transplante de medula óssea (TMO) autólogo e transplante de medula óssea alogênico.

- TMO autólogo

  Vários critérios já foram utilizados para se estabelecer o início da Leucaférese, como número absoluto de leucócitos, números de células mononucleares e a concentração de células CD34+, porém o número de leucócitos não tem correlação direta com o número de células CD34+ circulantes, portanto o melhor parâmetro para o início é a contagem de CD34+ circulantes no sangue periférico através de citometria de fluxo. Geralmente as coletas são iniciadas quando há a recuperação dos leucócitos após sua queda devido à quimioterapia mielossupressora. A quantificação de CD34+ é determinada quando o número total de leucócitos for superior a $2x10^9$L, sendo assim se o resultado da citometria de fluxo for superior a 10/µl inicia-se a primeira sessão de leucaférese. No entanto, esses critérios diferem de instituição para instituição. Estima-se que se a contagem de CD34+ estiver entre 10 a 15 µL uma sessão de leucaférese renderá aproximadamente 0,5 a $1x10^6$/Kg de células.

  Uma contagem seriada de CD34+ circulantes com valores inferiores a 10/µL e leucócitos superior a $30x10^9$L é considerado falha na mobilização, podendo assim esse paciente ser mobilizado pela segunda vez ou buscar alternativas como coleta de células progenitoras da medula óssea em combinação ou em substituição da coleta de células progenitoras de sangue periférico.

- TMO alogênico

  A mobilização no TMO alogênico apresenta alto grau de sucesso, e diferentemente do autólogo o início da leucaférese pode ser programado entre o 4º e o 6º dia do início da administração de G-CSF, pois o aumento de células CD34+ na circulação acontece dramaticamente no 4º dia e geralmente máximo no 5º dia. A coleta geralmente é realizada

em duas sessões de leucaférese e o rendimento de células CD34+ apresenta alto grau de variabilidade.

Coleta de Células Progenitoras do Sangue Periférico

Após o recrutamento das CPH para o sangue periférico, essas células serão coletadas através de um procedimento denominado aférese, que do grego *aphairesis* significa supressão. Esse procedimento é realizado em separador automático de células, que consiste na retirada do sangue total do paciente ou doador, separação dos componentes desse sangue, coleta da camada de células mononucleares e devolução dos demais hemocomponentes.

No mercado, atualmente, existem vários equipamentos de aférese para coleta de células progenitoras, como os equipamentos que operam com fluxo contínuo, onde a coleta, o retorno e a separação dos componentes ocorrem simultaneamente, e também equipamentos que operem com fluxo descontinuo, onde a coleta, a separação e o retorno são realizados em etapas distintas.

Independente do equipamento, os princípios utilizados para separação dos componentes são à força de centrifugação e o gradiente de densidade das células, separando assim a camada de células mononucleares onde se encontra as células progenitoras hematopoéticas.

A coleta de CPH pode ser realizada de duas formas, pela Leucaférese convencional quando são processadas até duas e meia volemias sanguíneas do paciente ou doador e também por Leucaférese de grande volume onde o volume a ser processado é maior, podendo atingir três ou mais volemias em uma única sessão. Estudos têm demonstrado que durante a Leucaférese de grande volume as células são recrutadas para circulação sanguínea.

O procedimento é realizado com um *kit* descartável e estéril, que será conectado ao equipamento, sendo preenchido com solução fisiológica e

anticoagulante realizando o *prime* no intuito de retirar todo o ar do sistema. Em procedimentos realizados com crianças de até 25 kg, onde o volume extracorpóreo ultrapassar 15% da volemia sanguínea, recomenda-se substituir o soro fisiológico por concentrado de hemácias irradiado e filtrado para realização do *prime*.

A duração da Leucaférese varia entre 3 a 5 horas e depende do volume de sangue a ser processado e também do fluxo sanguíneo adotado. Geralmente o fluxo sanguíneo usado gira em torno de 50 a 100 mL/min. O sucesso da coleta também depende do acesso venoso utilizado. Em pacientes quase sempre é necessário à colocação de um acesso venoso central, já em crianças o acesso venoso central é obrigatório. Em doadores o acesso venoso central só será utilizado se o mesmo não apresentar acesso venoso periférico adequado.

A solução citrato-dextrose fórmula A (ACD-A) tem sido utilizada com maior frequência na anticoagulação da leucaférese, porém a Heparina também pode ser utilizada principalmente em pacientes com alergias ao ACD-A e em pacientes pediátricos com a combinação do ACD-A. A anticoagulação se dá pela ligação do citrato ao cálcio ionizado, resultando na queda sérica do cálcio indispensável para o processo de coagulação. A relação sangue:anticoagulante deve manter-se entre 11:1 a 15:1, podendo variar de acordo com hematócrito e contagem de planquetas pré procedimento.

Durante o procedimento, um adulto pode receber cerca de 1000 mL de ACD-A, isso não acarretará na anticoagulação sistêmica do paciente devido a rápida metabolização hepática, porém alguns efeitos colaterais relacionados com a hipocalcemia podem ser encontrados como parestesia, tremores, cefaleia e náuseas. Geralmente esses sintomas são de leve intensidade e são revertidos com manobras simples como a diminuição da velocidade da reinfusão do ACD-A e administração intravenosa de gluconato de cálcio.

Durante o procedimento de coleta os sinais vitais deverão ser verificados a cada 30 minutos e os parâmetros da coleta anotados, e no início do

procedimento os pacientes devem ser orientados sobre o procedimento e sobre as possíveis reações.

A quantidade de sessões de leucaférese a ser realizada depende do rendimento de células CD34+/kg de peso do receptor. O valor mínimo aceitável para garantir uma boa recuperação hematopoética no pós transplante em um transplante autólogo é de 2.0 a $2.5x10^6$/kg. No entanto o número de células CD34+ está diretamente relacionado com a recuperação plaquetária mais acelerada, diminuição da internação, redução dos episódios febris e do uso de antimicrobianos. Portanto estudos tem demonstrado boa recuperação em receptores que receberam valores iguais ou superiores a $5.0x10^6$/kg. Os valores mínimos para doadores alogênicos HLA compatíveis é de $2.0x10^6$/kg. Devemos lembrar que o valor de células CD34+ coletas é diretamente proporcional ao número dessas células no sangue periférico e a quantidade de volemias processadas. Normalmente são necessárias de 1 a 4 sessões de leucaférese para se atingir o número adequado para o transplante.

Considerações Finais

Atualmente a coleta de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico para transplante vem tendo um crescimento considerável isso é decorrente de duas razões principais, como, o número de células progenitoras que podem ser obtidas após a mobilização, onde a quantidade de CHP no sangue periférico após a mobilização pode ser igual ou superior se comparado com a medula em condições basais, sendo assim, possibilitando uma coleta de células CD34+ de 10 a 20 vezes maiores se comparado com a coleta de células progenitoras da medula, e a outra razão é a rápida recuperação observada com as CPH mobilizadas de sangue periférico devido à capacidade de promover uma recuperação hematopoética em menor tempo quando comparada com células progenitoras não mobilizadas da medula.

Referência Bibliográfica

CECYN, Karin Z.; OGURO, Tsutomu. Coleta e Preservação de Células Progenitoras Hematopoéticas. In: BORDIN, José O.; LANGHI JUNIOR, Dante M.; COVAS, Dimas T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática.** São Paulo: Atheneu, 2007.

COMBS, Martha Era; *et al.* **Technical Manual.** 15 ed. Bethesda:AABB Associação Americana de Bancos de Sangue, 2005.

JUNIOR, Alfredo M. **Coleta de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico após administração de ciclofosfamida e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF): uma análise de 307 pacientes.** Tese de Doutorado em Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

JUNIOR, Alfredo M. Sangue periférico como fonte de células para terapia celular. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** São Paulo, 2009; 31 (Supl. 1):19-24.

JUNIOR, Francisco C. S.; *et al*. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** São Paulo, 2009; 31(Supl. 1):53-58.

KLEIN, Harvey G.; ANSTEE, David J. **Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine.** 11 ed. Wiley, Blackwell Publishing, 2005.

LEMONI, Roberto M.; D'ADDIO, Alessandra. Hematopoietic stem cell mobilization. **Haematologica** Bologna, 2008; 93(3): 321-324.

TERAPEUTICA TRANSFUSIONAL. **Manual para Médicos.** Trad. Youko Nukui e Marcelo Gil Cliquet. 7.ed. AABB Associação Americana de Bancos de Sangue, 2003.

VIGORITO, Afonso C; SOUZA, Cármino A. Transplante de células-tronco hematopoéticas e a regeneração da hematopoese. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** Campinas, 2009; 31(4):280-284.