



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Lia Beatriz Mantovani Lopes

**Monitoramento da Qualidade do Processamento
Laboratorial no Transplante Autólogo de Células Progenitoras
Hematopoéticas.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre (a) em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

Botucatu – SP

2021

LIA BEATRIZ MANTOVANI LOPES

**Monitoramento da Qualidade do
Processamento Laboratorial no Transplante
Autólogo de Células Progenitoras
Hematopoéticas.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre (a)
em Pesquisa e Desenvolvimento:
Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

Botucatu – SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lopes, Lia Beatriz Mantovani.

Monitoramento da qualidade do processamento
laboratorial no transplante autólogo de células
progenitoras hematopoéticas / Lia Beatriz Mantovani
Lopes.

- Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de
Medicina de Botucatu

Orientador: Marjorie de Assis

Golim Capes: 33004064

1. Células-tronco hematopoéticas. 2. Transplante
autólogo. 3. Indicadores de qualidade em
assistência à saúde. 4. Biotecnologia.

Palavras-chave: Células-tronco hematopoéticas;

DEDICATÓRIA

“A Deus que me proporcionou o dom da vida como também de estudar a mesma. Tentando compreender o maior milagre de todos, me aproximei Dele, através da vida Ele me deu vida”

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeira instância a Deus. Como criador nos fez dotados de inteligência para compreendermos os maiores mistérios do universo e ao mesmo tempo nos instiga para tal. A Ti minha vida para todo sempre.

Agradeço ao meu marido Lucas por ter me ajudado (tanto nas tarefas diárias como neste trabalho), compreendido, apoiado, sendo meu parceiro em todos os aspectos da vida e não medindo esforços para estar ao meu lado. A você, meu futuro e nossa família.

Agradeço aos meus pais, Marcos e Claudinéia e ao meu irmão Leonardo, que não mediram esforços para que este trabalho fosse possível, desde o ventre até esse presente momento, sendo base e fortaleza em meio às tempestades da vida, proporcionando paz quando só havia caos, alegria quando meu alimento era lágrima, sorrisos em meio à dor. A vocês todo o meu amor e gratidão.

Agradeço a minha orientadora Marjorie Golim por todas as conversas, conselhos e momentos onde estivemos juntas. Ensinar é uma arte que poucos detêm você é uma dessas pessoas, pois me ensinou muito sobre o trabalho como também sobre a vida. O exemplo que você me passa como profissional me faz querer ser uma profissional melhor todos os dias. Agradeço a minha amiga e companheira de laboratório Aline Braz, sendo ela também um exemplo de profissional sempre me incentivando e contribuindo para que esse trabalho se realizasse. A vocês meu profissionalismo e lealdade.

Agradeço aos meus amigos que de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho, sendo esses: Francielle Ramalho; Rodrigo Lima; Mariana Puatto; Luis Guilherme Chimeno e Larissa Binelli. Esses muito me auxiliaram no processar das informações, na escrita do trabalho, no carinho de um simples “bom dia” que muito me fazia a diferença. A vocês meu carinho e saudade.

Agradeço a todos os funcionários do Hemocentro, envolvidos no TMO, em especial as enfermeiras Cláudia e Karina, por seus papéis fundamentais não apenas neste trabalho, mas como também na realização deste serviço no HCFMB.

Agradeço aos familiares e amigos que estão junto a mim nessa jornada. Tios, tias, primos, primas que sempre cuidando me ajudaram a encontrar meu lugar nesse mundo. Minhas avós Maria Aparecida, Maria e Doraci, ao meu saudoso avô Waldemar Furlan, que durante a escrita deste trabalho veio a se encontrar em um lugar melhor que nosso. Aos meus sogros Carlos e Valdete, meus cunhados Henrique, Felipe, Angélica e Isaac que sempre estiveram atentos às minhas necessidades e na medida do possível me ajudavam e incentivavam. Aos amigos Juliano Novak, Amanda Santos, Marcus Andrade, Larissa Ângelo, Daniela Sanches, Marcela Moura e Ana Cely que caminham junto a mim desde longa data, tornando essa caminhada mais leve e feliz. A vocês meus sorrisos e risadas, por quanto tempo elas durarem.

A todos os citados, este trabalho tem a marca de vocês em cada letra escrita.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

LOPES, LBM. **Monitoramento da Qualidade do Processamento Laboratorial no Transplante Autólogo de Células Progenitoras Hematopoéticas**. 2021. 58 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

RESUMO

O Transplante de Células Tronco Hematopoética Autólogo (TCTH-auto) é terapia consolidada para tratamento de patologias onco-hematológicas e consiste em reestabelecer a função medular através da infusão intravenosa de células progenitoras hematopoéticas (CPH) do próprio paciente. Este estudo teve como objetivo caracterizar indicadores de qualidade na etapa de processamento laboratorial do TCTH-auto, através de análise retro-prospectiva de dados de pacientes submetidos ao Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB). Neste contexto, a implementação de indicadores que permitam checar etapas do processo, são muito relevantes para sanar questões que encontramos durante e ao final deste. Os dados coletados compreendem o período de agosto de 2016 a dezembro de 2020, totalizando 107 pacientes, dos quais foram coletadas variáveis envolvidas no processo de TCTH-auto, e posteriormente submetidas à análises estatísticas convencionais e análises de dados avançadas, como técnicas de *Machine Learning*, árvore de decisão, Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Discriminante Linear (LDA). As análises de *Machine Learning* nos permitiram identificar a partir do conjunto total de dados, um preditor da eficiência do processo de TCTH-auto, o CD34+ pré. Embora este também seja principal preditor do momento ideal da coleta por aférese, e isto já esteja bem consolidado na literatura e na prática clínica, os resultados do presente estudo validam o desempenho do serviço de transplantes. Diferencial foi estabelecido aplicando-se o algoritmo J48, culminando na obtenção de árvore de decisão preditiva que estabelece valores de corte. Quando a contagem de CPH no sangue periférico for >23 CD34/ μ L indica alta probabilidade da coleta ser eficiente, já valores de CD34 ≤ 23 / μ L indicam menor probabilidade de eficiência. A análise de Componentes Principais (PCA), indicou que as duas variáveis que apresentam maior correspondência com a eficiência da aférese são CD34+ pré

e hematócrito (Ht). Utilizando-se a Análise de Discriminante Linear (LDA) elaborou-se a equação (*score*) para predição da eficiência, combinando valores absolutos de CD34+ pré e Ht, a qual pode ser aplicada especialmente quando os valores de CD34+ estiverem menores que 23 μ L. Se o resultado da equação for $\leq -0,14$ a probabilidade de eficiência na coleta é maior, no entanto se $>-0,14$ a probabilidade de eficiência é baixa. Este indicador possibilita a realização da coleta em pacientes com CD34+ $<23\mu$ L. Outro indicador que pode ser adotado é o coeficiente de eficiência (CE) que possibilita avaliar a eficiência da leucaférese. Aplicando este indicador, observamos que temos obtido eficiências superiores às estimadas, de modo que podem ser estabelecidos maiores índices de estimativa de aférese. Diante do exposto, a identificação de potenciais indicadores de qualidade nas etapas desse processo que venham assegurar a qualidade do transplante de medula realizado no HCFMB, buscando a excelência e, tendo em vista o aumento de demanda neste serviço de abrangência regional, são de suma importância, entendendo-se que os resultados gerados por este estudo terão aplicabilidade imediata e poderão trazer melhorias na gestão da qualidade deste serviço de alta complexidade no âmbito do SUS.

Palavras-chaves: Células-Tronco Hematopoéticas; Indicadores de Qualidade em Assistência à Saúde; Transplante Autólogo.

LOPES, LBM. **Monitoring the Quality of Laboratory Processing in Autologous Hematopoietic Progenitor Cell Transplantation.** 2021. 58 p. Thesis (Master's degree). Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, 2021.

ABSTRACT

The Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT-auto) is a consolidated therapy for the treatment of onco-hematologic pathologies and consists of reestablishing the medullary function through the intravenous infusion of the patient's own hematopoietic progenitor cells (PHC). This study aimed to characterize quality indicators in the laboratory processing stage of the HSCT-auto, through the analysis of retrospective data from patients undergoing Bone Marrow Transplantation at Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine of Botucatu (HCFMB). In this context, the implementation of indicators that allow checking stages of the process are very relevant to resolve issues we encountered during the process. The collected data cover the period from August 2016 to December 2020, totaling 107 patients, of which variables involved in the HSCT-auto process were collected, and later submitted to conventional and advanced statistical analysis, such as Machine Learning techniques, tree of decision, Principal Component Analysis (PCA) and Linear Discriminant Analysis (LDA). Machine Learning analyzes allowed us to identify, from the total data set, an efficiency predictor of the HSCT-auto process, the CD34+ pre, which is the main predictor of the ideal moment of apheresis collection. Although this predictor is already well established in the literature and in clinical practice, the results validate its performance in our service. However, a differential was established by applying the J48 algorithm, resulting in a predictive decision tree that establishes cutoff values. When the CPH count in peripheral blood is >23 CD34/ μ L indicates a high probability of being efficient collection, while CD34 values ≤ 23 / μ L indicate a lower probability of efficiency. The Principal Component Analysis (PCA) indicated that the two variables that present the greatest correspondence with the efficiency of apheresis are CD34+ pre and hematocrit (Ht). Using Linear Discriminant Analysis (LDA), the equation (score) for efficiency prediction was elaborated, combining absolute values of

CD34+ pre and Ht, which can be applied especially when CD34+ values are less than 23 μ L. If the result of the equation is ≤ -0.14 the probability of efficiency in collection is higher, however if >-0.14 the probability of efficiency is low. This indicator makes it possible to carry out the collection in patients with CD34+ $<23\mu$ L. Another indicator that can be adopted is the coefficient of efficiency (EC), which makes it possible to assess the efficiency of leukapheresis. Applying this indicator, we observe that we have obtained efficiencies higher than those estimated, so that higher apheresis estimation rates can be established. Given the above, the identification of potential quality indicators in the stages of this process that will ensure the quality of the bone marrow transplant performed at the HCFMB, seeking excellence and, in view of the increased demand in this service with regional coverage, is of paramount importance, it being understood that the results generated by this study will have immediate applicability and may bring improvements in the quality management of this highly complex service within the SUS.

Keywords: Hematopoietic Stem Cells; Health Care Quality Indicators; Autologous Transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação Internacional das Células-Tronco levando em consideração a classe, os tipos celulares e a diferenciação

Figura 2 – Hematopoese

Figura 3 – Mobilização das CPHs da medula óssea para o sangue periférico

Figura 4 – Etapas do processo de transplante de medula óssea autólogo

Figura 5 – Gráfico demonstrando desempenho de mobilização

Figura 6 – Boxplot do esquema de estímulo em relação ao CD34+_pré

Figura 7 – Boxplot do esquema de estímulo em relação ao CD34+_pré

Figura 8– Árvore de decisão obtida pela aplicação do algoritmo J48 no conjunto de dados completo

Figura 9 – Boxplot de CD34+ agrupado pela eficiência da aférese

Figura 10 – Análise de Componentes Principais utilizando o pacote factoextra software R

Figura 11 – Análise de Discriminante Linear

Figura 12 – Boxplot relacionando o modelo LDA com a eficiência ou não eficiência da aférese

Figura 13 – Boxplot relacionando Ht com eficiência ou não eficiência da aférese

Figura 14 – Boxplot de CD34+_pré em relação ao diagnóstico

Figura 15 – Boxplot do produto da aférese em relação ao diagnóstico

Figura 16 – Boxplot da enxertia medular em relação ao produto da aférese

Figura 17 – Boxplot da enxertia medular em relação ao volume da bolsa de aférese

Figura 18 – Boxplot comparando CE por ano de serviço

Figura 19 – Boxplot comparando o CE dos equipamentos de aférese

Figura 20 – Boxplot comparando CE com os diagnósticos

Figura 21 – Boxplot comparando Delta CE com os diagnósticos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes elegíveis ao TCTH-auto de acordo com gênero, diagnóstico e regime de condicionamento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Coeficiente de Eficiência
CIBMTR	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
CTE	Célula-Tronco Embrionária
CTN	Célula-Tronco Neural
CTG	Célula-Tronco Germinativa
CTH	Célula-Tronco Hematopoética
CTM	Célula-Tronco Mesenquimal
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
HCFMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
HLA	Antígeno de Histocompatibilidade
HT	Hematócrito
IPS	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> (células-tronco pluripotentes induzidas ou células reprogramadas)
ISHAGE	<i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>
LDA	Análise Discriminante Linear
LFH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma não Hodgkin
MM	Mieloma Múltiplo
ML	<i>Machine Learning</i>
PBSC	<i>Peripheral Blood Stem Cell</i> (células-tronco do sangue periférico)
PCA	Análise de Componentes Principais
PE	Ficoeritrina
TCTH-auto	Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas Autólogo
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TMO	Transplante de Medula Óssea

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1 Contextualização Histórica do Transplante de Medula Óssea.....	16
1.2 O Conceito de Transplante de Medula Óssea.....	17
1.3 Indicadores de Qualidade.....	24
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. Casuística e Métodos.....	28
3.1 Análises de Dados.....	29
4. Resultados.....	30
4.1 Caracterização dos pacientes.....	30
4.2 Mobilização das CPHs.....	31
4.3 Quantificações do CD34+ do sangue periférico.....	33
4.4 Coleta de CD34+ na aférese.....	38
4.5 Enxertia medular.....	39
4.6 Eficiência.....	41
5. Discussão.....	45
6. Conclusão.....	50
7. Referência.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

A história do transplante de medula óssea tem aspectos peculiares, desde os estudos iniciais até a láurea do Prêmio Nobel de Medicina, concedida ao Dr. E. Donnall Thomas em 1990.

As primeiras pesquisas que visaram utilizar a medula óssea para tratar distúrbios hematológicos foram realizadas por Brown-Sequard no final do século XIX. No entanto, a primeira utilização intravenosa de medula óssea foi realizada por Osgood cerca de 50 anos depois, como parte do tratamento em uma paciente com anemia aplástica, porém sem sucesso (AKIL, 2018; CORGOZINHO, 2012). Os estudos observacionais em modelos experimentais mostravam que a infusão de componentes de uma medula óssea saudável em outra medula mielossuprimida poderia induzir a recuperação de sua função no receptor (KHADDOUR; HANA; MEWAWALLA, 2020).

Em 1949, JACOBSON e colaboradores demonstraram que ao proteger o baço contra uma dose de irradiação letal, o efeito nocivo era diminuído e a aplasia medular poderia ser minimizada. Com base nestas evidências, LORENZ et al. (1951) realizaram infusão intravenosa de medula óssea em camundongos após a irradiação letal, reafirmando o resultado protetor (THOMAS et al., 1999).

O primeiro transplante de medula óssea efetivo em seres humanos foi realizado por E. Donnall Thomas e sua equipe, em 1957. Foi um transplante singênico, realizado entre gêmeos monozigóticos, para tratamento de leucemia aguda (HENIG, 2014; KHADDOUR; HANA; MEWAWALLA, 2020).

Em 1968, em Minnessota - EUA, o médico Robert Good realizou o primeiro TMO alogênico em uma criança com imunodeficiência combinada grave (KHADDOUR; HANA; MEWAWALLA, 2020; CORGOZINHO, 2012). Logo depois, em 1969, E. Donnall Thomas e seu grupo realizaram em Seattle - EUA um TMO alogênico com a utilização de radioterapia em um paciente portador de leucemia, que recebeu altas doses de irradiação corporal total, seguido da infusão de medula óssea de seu irmão. Por suas pesquisas sobre o desenvolvimento de TMO Dr. Thomas foi laureado com o Prêmio Nobel de

Fisiologia e Medicina em 1990 (CORGOZINHO, 2012; KHADDOUR; HANA; MEWAWALLA, 2020; HENIG; ZUCKERMAN, 2014).

Desde então, o campo evoluiu e expandiu-se em todo o mundo. Novas indicações além de leucemia aguda e da anemia aplástica têm sido constantemente exploradas e agora incluem distúrbios congênitos do sistema hematopoético, distúrbios metabólicos e doenças autoimunes.

1.2 O CONCEITO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

As células-tronco têm características únicas, são células não especializadas que podem se reproduzir continuamente por meio da divisão celular assimétrica. Existem diferentes tipos de células-tronco que dependem de sua origem e potencialidade, as quais podem ser didaticamente classificadas quanto à sua diferenciação em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes, unipotentes, ou ainda, de acordo com o tecido de origem: embrionária, fetal, adulta (DESSEN; MINGRONI-NETTO, 2007; JANSEN et al., 2005).

As células-tronco adultas podem ainda ser classificadas em mesenquimais, hematopoiéticas e neurais. As características, classe (propriedade referente à plasticidade da célula), tipos celulares e tipo de diferenciação estão resumidos na figura 1.






Classe	Tipos Celulares	Tipo de Diferenciação
 Totipotente	Célula Tronco Embrionária do zigoto (CTE). Do 1 ^o ao 5 ^o dia pós fecundação	Em qualquer tipo de células incluindo anexos embrionários
 Pluripotente	Célula Tronco Embrionária do blastocisto (CTE) e iPSCs	Em >200 tipos celulares dos 3 folhetos embrionários, MAS não são capazes de diferenciar-se em anexos embrionários
 Multipotente	Célula Tronco Adulta (CTA): Fetal, Cordão Umbilical e Adulta	Diferencia-se em pelo menos 3 diferentes tipos celulares com origem no mesmo folheto embrionário
 Oligopotente	Célula Tronco Adulta (CTAo), linfóide e mieloide	Habilidade de se diferenciar em poucas células
 Unipotente	Célula Tronco Adulta (CTAu), tecidos específico	Célula Tronco Adulta, comissionada para um único tecido, por exemplo: pele...

Figura 1- Classificação Internacional das Células-Tronco levando em consideração a classe, os tipos celulares e a diferenciação.

A célula-tronco hematopoética (CTH) ou também conhecida como célula progenitora hematopoética (CPH) é a responsável pela diferenciação de todas as linhagens sanguíneas maduras, levando à reconstituição da população hematopoética a partir de uma única célula (GASPER, 2000; HERZOG et al., 2003; JANSEN et al., 2005; SANTOS, 1983).

As CTHs, por serem precursoras primitivas, possuem a capacidade de realizar divisões celulares assimétricas ilimitadas, portanto, as células-filhas podem tanto se estabilizar como permanecerem indiferenciadas, repondo o *pool* de células-tronco (tal evento se faz conhecido como autorrenovação), quanto são capazes de se diferenciar em qualquer linhagem celular hematopoética: linhagem mielóide – que dará origem às hemácias, plaquetas, granulócitos e monócitos e linhagem linfóide que dará origem aos linfócitos –, desta forma estabelecendo a produção de todas as células sanguíneas. A figura 2 ilustra o processo da hematopoese. (CARVALHO; GOLDENBERG, 2012; KOEPESELL; JACOB; MCKENNA JR, 2014).

As CTHs podem ser obtidas a partir da medula óssea, sangue periférico ou sangue do cordão umbilical, no entanto, são encontradas em maior concentração na medula óssea. Nesse microambiente, envolto de células estromais e matriz extracelular, as mesmas sofrem intervenção de sinais regulatórios que estimulam as CTHs a formar uma célula idêntica a ela, de longo prazo, que permanece no microambiente e retém sua identidade de CTHs pluripotente, enquanto a outra cópia tem curto prazo, maior grau de diferenciação e é denominada de progenitora multipotente (DESSEN; MINGRONI-NETTO, 2007).

No sangue periférico de um doador saudável a concentração de CTH circulante é quase nula, variando entre 0,01 a 0,05% quando comparada a outros constituintes celulares (KORBLING; ANDERLINI, 2001).

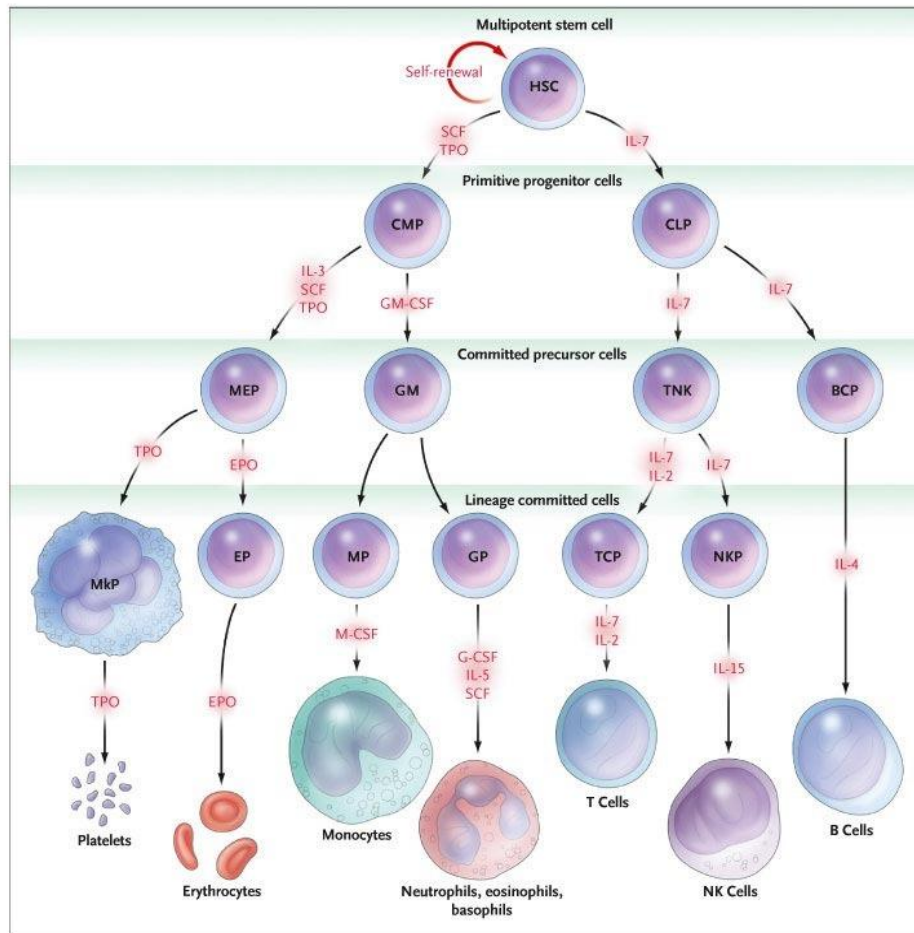


Figura 2- Hematopoese. Diagrama mostrando a célula-tronco multipotente da medula óssea e as linhagens celulares que dela se originam. Fonte: Kaushansky K. N Engl J Med 2006;354:2034-2045.

O transplante de medula óssea envolve a administração de células-tronco hematopoéticas saudáveis em pacientes com disfunção ou depleção medular, sendo um procedimento altamente especializado, que possibilita gerar células funcionais que podem substituir as disfuncionais (KHADDOUR; HANA; MEWAWALLA, 2020). A destruição das células doentes é feita através da administração de quimioterapia e/ou radioterapia de altas doses (LEMONS et al., 2018).

Tal prática é utilizada para o tratamento de doenças diversas, síndromes mielodisplásicas, leucemias agudas e crônicas, anemia falciforme, linfomas, mieloma múltiplo, anemia aplástica grave, neuroblastoma, algumas doenças autoimunes, como a *diabetes mellitus* tipo I, incluindo algumas neoplasias sólidas (AKIL, 2018).

Existem dois tipos de transplantes de CTHs, transplante alogênico e o transplante autólogo. No transplante alogênico, além das drogas do regime de condicionamento que podem ser mieloablativos ou não mieloablativos, a depender das condições do paciente e da decisão do corpo clínico, faz uso de medicamentos imunossupressores, tendo como objetivo preparar o receptor, para que não haja rejeição do enxerto. Já o transplante autólogo faz uso de altas doses de quimioterapia e/ou radioterapia, danificando a medula óssea para que posteriormente a infusão das células-tronco do próprio paciente regenere a medula óssea danificada (BOGLARKA; BRENDA, 2014).

O transplante alogênico faz uso das células-tronco de doador saudável e compatível. O teste de compatibilidade é realizado através da tipagem do antígeno de histocompatibilidade (HLA do doador e do receptor), sendo aparentado (geralmente irmãos) ou não aparentado (através de bancos de medula). A mobilização de CTH do transplante alogênico e do autólogo é feita da mesma forma (DELAMAIN, 2004).

Segundo dados obtidos do *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR), em 2013 nos EUA o número de transplantes alogênicos ultrapassou 8.000 procedimentos. Em 2019, alcançou 9.498 transplantes realizados. Desde 2000, o transplante autólogo vem aumentando gradativamente, atingindo a marca de 14.270 transplantes em 2019 (PHELAN; ARORA; CHEN, 2020).

No transplante autólogo utilizam-se células-tronco do próprio paciente, mas como as CTHs não são comumente encontradas no sangue periférico, faz-se necessária uma mobilização celular mediante administração de fatores de crescimento. Ao se utilizar medicações como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e/ou determinado quimioterápico é possível se motivar o trânsito de CTH da medula óssea para o sangue periférico. Para os procedimentos de mobilização, as abordagens fundamentais são três diferentes: as pautadas no uso de agentes químicos, de fatores de crescimento hematopoiéticos ou a junção dos dois. Devido a sua comprovada eficácia e toxicidade mínima, a G-CSF é uma das moléculas mais utilizadas como protocolo de mobilização, com capacidade de aumentar em proporções consideráveis o nível de células progenitoras hematopoiéticas presentes no sangue periférico (BABIC; EUGENIA, 2018). O G-CSF é uma glicoproteína que

foi compreendida há mais de vinte anos, possuindo a aprovação do FDA e é costumeiramente usada no tratamento de neutropenia (BURGESS, 1980), como também para transplantes de medula óssea (WELTE et al., 1985; BEGLEY et al., 1986). Dentre as fontes de G-CSF se inclui os monócitos, células mesoteliais, fibroblastos e células endoteliais. O G-CSF incentiva o aumento de precursores de neutrófilos e regula de modo fulcral a sobrevivência de neutrófilos maduros, pós-mitóticos, por meio da inibição da apoptose (WELTE et al., 1985; BEGLEY et al., 1986; HU; YASUI, 1997).

Na prática clínica, a G-CSF humana apresenta-se de duas maneiras, contempladas pelos medicamentos Filgrastim e Lenograstrim. Quando se trata de transplantes autólogos de medula óssea, estudos apontam a aplicação de Filgrastim aliado ou não à quimioterapia, sendo o protocolo de mobilização de maior utilização, usado majoritariamente para casos de mieloma múltiplo (AFIFI et al., 2016).

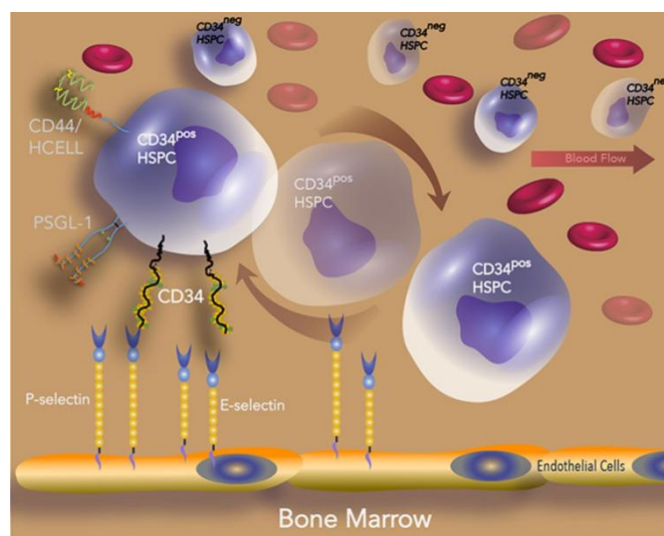


Figura 3 - Mobilização das CTHs da medula óssea para o sangue periférico. Fonte: AbuSamra DB et al., 2017

Esse aumento de disponibilidade de CTH para o sangue periférico favorece a extração dessas células através de um processo de coleta seletiva realizado de forma automatizada, conhecido como aférese (TIWARI et al., 2016; MOOG, 2006). Essa técnica tem sido usada em mais de 90% dos transplantes autólogos de medula óssea (BALDOMERO et al., 2011; CASTRO, 2002; MILONE et al., 2003). Consiste na separação dos elementos do sangue através

do princípio da diferença de densidade e força gravitacional. Uma vez realizado o processo de centrifugação, remove-se um ou mais constituintes sanguíneos, segundo a programação otimizada para a coleta a célula de interesse. Nesse caso, em específico, objetiva-se coletar a camada leucocitária, enriquecida de células mononucleares, característica morfológica das células-tronco hematopoiéticas. Em seguida, a bolsa com o produto da aférese é processada e criopreservada, enquanto o paciente é submetido à quimioterapia combinada, para posteriormente as células-tronco criopreservadas serem reinfundidas para repovoamento da medula óssea (SCOTT; GORDON, 1995).

O uso das CTHs conta com vantagens que incluem recuperação hematopoética mais rápida, melhor reconstituição imunológica e o processo de coleta relativamente fácil, ao passo que a recuperação medular mais rápida é creditada ao maior número de células (CD34+) obtidas através da coleta por sangue periférico após a mobilização (KESSIGER; SHARP, 2003; AZEVEDO; RIBEIRO, 2000).

As CTHs expressam em sua superfície os antígenos CD34+ e CD45+. A quantificação destas é feita mundialmente por citometria de fluxo, tanto no sangue periférico quanto no produto coletado por aférese, avaliando o perfil imunofenotípico com expressão CD34+/CD45+, sendo o fator preditor padrão-ouro para definição do momento da coleta (LEMOS et al., 2018). A quantidade de células CD34+ é usada para guiar o início da coleta de CTH por aférese, e também como indicador de eficiência desta. De modo geral, o consenso para iniciar a leucaférese é um resultante de células CD34⁺ maior que 10-20 células/ μ L no sangue periférico. Já na coleta da leucaférese, de acordo com Pierelli et al. (2012) a quantia mínima recomendada de células CD34⁺ em um transplante é de 2×10^6 /Kg de peso do receptor, sendo que a quantia ideal de células é fator chave para o sucesso do transplante.

Nos regimes de mobilização voltados aos transplantes autólogo e alogênico é utilizado o G-CSF fazendo uso ou não de quimioterapia (citotóxica). O G-CSF é ofertado na dose de 10 μ g /kg de peso corporal/dia, sendo que quando utilizado de modo isolado induz pico celular, em geral, no 5º dia. Sendo assim, a coleta de CTH é prevista no período entre o quarto e sexto dia de mobilização (TO et al., 1997). Em nossa instituição foi estabelecida a quantificação de CD34+ no 4º dia (D4) e 5º dia (D5) do uso de G-CSF, pré-

coleta, sendo o D5 o provável dia de realização da leucaférese. Vale ressaltar, que alguns pacientes fazem pico de mobilização tardio (D6, D7). Deste modo, quantificações de CD34+ podem ser necessárias em dias subsequentes, para identificar o momento ideal de coleta, ou mesmo para decidir sobre coletas consecutivas, sobretudo esta decisão é tomada baseada em critérios clínicos (MAKAR et al., 2014).

Quando se utiliza da associação de vinorelbina e filgrastima para quimiomobilização de CPHs a leucaférese é prevista para o 8º dia de mobilização celular (SAMARAS et al., 2015).

O protocolo para quantificação de CD34⁺, descrito em 1995 pela *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE), é até hoje adotado. Trata-se de um método simples, rápido, de alta sensibilidade e especificidade, realizado por citometria de fluxo, sendo conveniente à aplicação clínica. O método ISHAGE pode ser realizado por plataforma dupla, necessitando de dados da leucometria total, oriundos do hemograma, ou em plataforma única, usando apenas a tecnologia de citometria de fluxo, associando marcadores fenotípicos, de viabilidade e *beads* de valores conhecidos, de modo a obter valores percentuais e absolutos de células CD34⁺ ao final do processo (GRATAMA et al., 1998; SUTHERLAND et al., 1996; LEMOS et al., 2018). A garantia da qualidade dos processos envolvidos na identificação das populações celulares de interesse é fundamental para obtenção de resultados adequados.

Em geral, as células-tronco hematopoiéticas passam pelo processo de criopreservação, tornando possível o congelamento e a infusão futura no paciente, segundo protocolo clínico estipulado. Sempre que existe a possibilidade de infusão no período de 48 horas pós-coleta, o processo de congelamento não se faz necessário e as CTHs podem ser armazenadas sob refrigeração (de 2 a 8°C) e infundidas a fresco (GATTI, 2019).

A administração de altas doses de quimioterapia faz parte processo denominado regime de condicionamento, que tem como foco destruir as células doentes do paciente para que as CTHs provenientes do enxerto possam repovoar a medula óssea, restabelecendo a produção de células sanguíneas saudáveis (CARRERAS et al., 2019).

Uma vez finalizado o regime de condicionamento, as CTHs criopreservadas são descongeladas para o processo de infusão no paciente. A etapa de descongelamento ocorre de maneira rápida, em banho-maria a 37-40°C à beira do leito, para infusão imediata (SANTIS; PRATA, 2009). Os processos descritos acima (mobilização, coleta, processamento, condicionamento, criopreservação e reinfusão das CTHs) estão representados na figura 4.

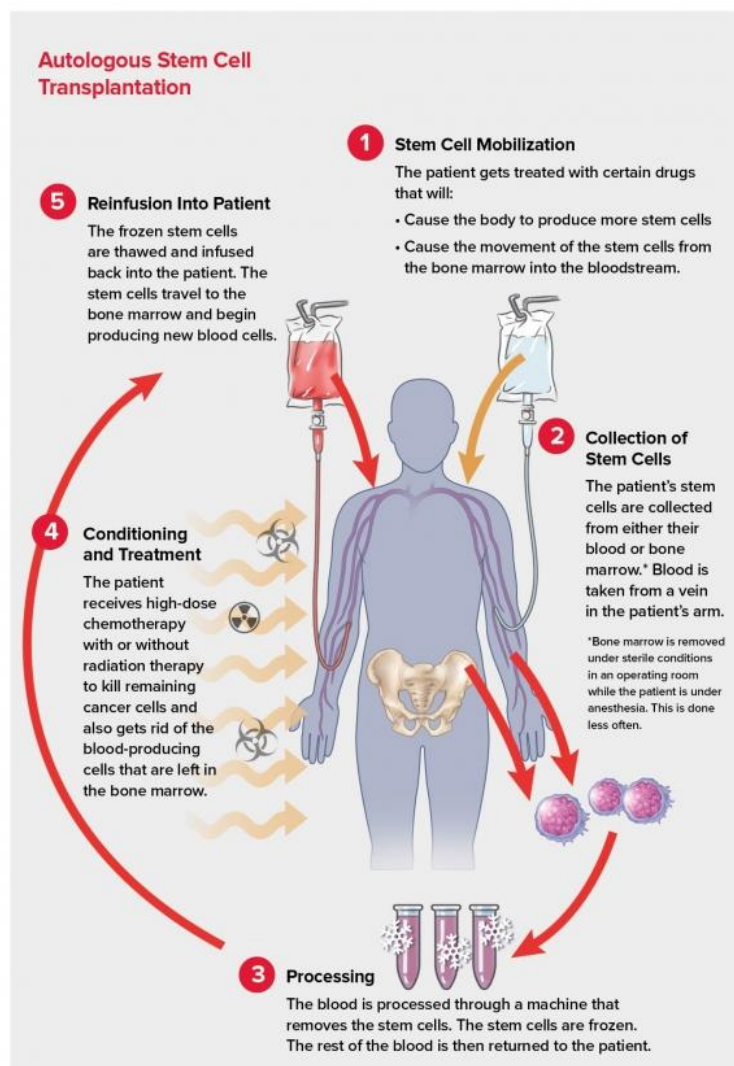


Figura 4- Etapas do processo de Transplante Autólogo de Medula Óssea.
Fonte: <https://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/stem-cell-transplantation/autologous-stem-cell-transplantation>.

1.2 Indicadores de Qualidade

O processo de transplante pode ser monitorado através de indicadores, de modo que a qualidade do serviço possa ser assegurada. Neste contexto, analisamos como e quais indicadores contribuem para a melhoria contínua dos serviços de TMO.

Indicadores de qualidade caracterizando-se em dados numéricos (métrica), obtidos de maneira confiável e seguindo um padrão, permitem avaliar a eficiência de um processo mediante a uma meta estipulada, tendo como objetivo identificar inconsistências (se houverem) ou maneiras de melhorar a eficiência dos processos, possibilitando intervenções, com foco em manutenção ou melhoria no atendimento frente às necessidades dos clientes (OLIVEIRA; MENDES, 2010).

Muitos são os parâmetros necessários para que se concretize o sucesso em programas e serviços de saúde, sendo fundamental entre eles, a medição da quantidade e qualidade de resultados, processos e estruturas utilizadas. Isto se faz necessário para o planejamento, organização, coordenação/direção e avaliação/controlar das atividades desenvolvidas. Os comparativos entre metas, dados, fatos, informações, o desenvolvimento de indicadores internos e externos, são ferramentas essenciais para que se possa conceber as mudanças acarretadas em uma instituição (BITTAR, 2001).

O Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) iniciou suas atividades em agosto de 2016, com a modalidade de transplante autólogo (Nº do SNT: 1 21 14 SP 60). Estes anos de experiência possibilitaram avaliar o cenário atual das atividades desenvolvidas, bem como realizar análises críticas, vislumbrando implementar melhorias no serviço. Adotamos condutas de mobilização, quantificação celular, coleta e criopreservação baseadas em protocolos internacionais. No entanto, há particularidades em cada serviço, em virtude da diversidade das práticas clínico-laboratoriais.

Neste contexto, a implementação de indicadores que permitam checar etapas do processo, são muito relevantes para sanar questões que encontramos durante este, como: caracterizar o tempo de monitoramento da mobilização de CD34 para o sangue periférico na predição do momento ideal

da coleta por aférese; avaliar a relevância da quantificação de CD34 pós-aférese; definir valores de referência próprios do serviço para melhor predição do momento da aférese; estabelecer cálculos de eficiência da coleta personalizados ao serviço; analisar a correlação entre CD34 periférico e CD34 do produto da aférese.

Estas variáveis foram comparadas a relatos da literatura, baseada na experiência de outros serviços de TMO, buscando caracterizar indicadores de qualidade.

Diante do exposto, a identificação de potenciais indicadores de qualidade nas etapas do processo, que venham assegurar a qualidade do transplante de medula realizado no HCFMB, buscando a excelência e, tendo em vista o aumento de demanda neste serviço de abrangência regional, são de suma importância, entendendo-se que os resultados gerados por este estudo terão aplicabilidade imediata e poderão trazer melhorias na gestão da qualidade deste serviço de alta complexidade no âmbito do SUS.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar indicadores que permitam assegurar a qualidade do processo laboratorial de transplante de CTH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar casos atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu com indicação de transplante de células-tronco hematopoéticas (perfil epidemiológico, características da aférese, mobilização, enxertia medular);

2. Estabelecer a associação de fatores relacionados ao processo do transplante: gênero, idade, peso, doença de base, parâmetros hematológicos (hemograma), contagem de CD34 do sangue periférico e do produto da aférese, volume da bolsa, enxertia medular, esquema de mobilização;

3. Identificar e caracterizar indicadores de qualidade nas diferentes etapas do processamento laboratorial das CTHs.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

De acordo com a resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012, toda pesquisa envolvendo seres humanos, direta ou indiretamente, deve ser submetida à apreciação do sistema CEP/CONEP da unidade. Desta forma, o presente estudo obteve parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, onde foi realizada a pesquisa sob o CAAE: 15692819.4.0000.5411 e o número de parecer 3.482.323, sendo iniciado somente após esta aprovação.

Este foi um estudo retro-prospectivo, quantitativo, descritivo e longitudinal, com análise de dados de 107 pacientes submetidos ao serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os dados coletados foram referentes ao período de agosto de 2016 a dezembro de 2020.

Fez-se uso da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), convidando os pacientes que seriam submetidos ao procedimento a participar. Os pacientes que já haviam realizado transplante e permaneciam em acompanhamento na instituição, também foram convidados a participar. O Comitê de Ética em Pesquisa liberou a aplicação do TCLE apenas em caso de óbito do paciente ou para aqueles que não estavam mais em acompanhamento no serviço.

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu os casos de transplante autólogo de medula óssea são devidamente registrados em documentos físicos em cada setor e repassados posteriormente ao sistema eletrônico do Hospital (MV SOUL®).

Foram considerados como critérios de inclusão paciente com indicação de transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas, disponibilidades de dados estarem disponíveis para caracterização, de acordo com os critérios metodológicos do estudo. Não houve critérios de exclusão, de modo a obter uma visão geral dos casos atendidos no serviço.

Os dados coletados dos pacientes foram: informações demográficas (sexo, idade, doença hematológica); esquema de mobilização (drogas administradas); número de mobilizações realizadas; quantificação de CD34

periféricas; número de coleta de CTH/paciente; parâmetros hematológicos (leucócitos totais, hematócrito e plaquetas); cálculo de eficiência da coleta; quantificação de CTH no produto da aférese (bolsa), regime de condicionamento, tempo de enxertia medular.

3.1 Análises dos Dados

As análises estatísticas foram feitas no software R (versão 4.0.4 para Windows) disponível em <https://www.r-project.org/>. As variáveis foram comparadas através dos testes de *Mann Whitney* e *Kruskal Wallis*, onde o valor estatisticamente significativo foi de $p \leq 0,05$. Dados qualitativos e quantitativos foram descritos em tabelas e gráficos, apresentando mediana e valores mínimos e máximos.

Realizou-se análise de *Machine Learning* (ML) em todo o conjunto de dados para identificação de fatores que pudessem estar associados à eficácia do procedimento da aférese. Tal análise constitui-se de aprendizado de máquina supervisionado, sendo os dados analisados de forma independente.

Uma segunda análise, usando as variáveis em combinação visou prever a eficácia do produto da aférese através de equação matemática. Nesta análise somente variáveis quantitativas foram elencadas, sendo excluídas variáveis qualitativas. A seleção das variáveis que entrariam na equação foi realizada pela Análise de Componentes Principais (PCA), e para gerar a equação utilizou-se a técnica de Análise Discriminante Linear (LDA).

As análises dos dados foram realizadas pelo Prof. Dr. Rafael Plana Simões, que muito contribuiu na realização deste trabalho.

4. Resultados

4.1 Caracterização dos pacientes

Desde o início do serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) em agosto de 2016 até dezembro de 2020, foram admitidos 107 pacientes com indicação de TCTH-auto.

Do total, 69 (64,48%) são homens e 38 (35,51%) mulheres, com a mediana de 54 anos (mínimo/máximo: 19/71). Com relação à patologia, 58 (54,72%) foram diagnosticados com mieloma múltiplo, 18 (16,98%) com linfoma de Hodgkin, 29 (27,36%) linfoma não Hodgkin e 1 (0,94%) neoplasia maligna de testículo tópico. A tabela 2 descreve características clínicas com distribuição de gênero, tipo de patologia, regime de condicionamento.

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes elegíveis ao TCTH-auto de acordo com gênero, diagnóstico e regime de condicionamento.

	Número de pacientes (absoluto e relativo)
Gênero	
Feminino	38 (35,51%)
Masculino	69 (64,48%)
Diagnóstico	
Mieloma Múltiplo	59 (55,14%)
Linfoma de Hodgkin	18 (16,98%)
Linfoma Não Hodgkin	29 (27,36%)
Neoplasia Maligna de Testículo Tópico	01 (0,94%)
Regime de Condicionamento	
BEAM	02 (2,38%)
BEAC	10 (11,90%)
MEL	50 (59,52%)
LACE	22 (26,19%)

Legenda: BEAM (BCNU, etoposide, citarabina, melfalano); BEAC (BCNU, etoposide, citarabina, ciclofosfamida); LACE (lomustina, etoposide, citarabina, ciclofosfamida) e MEL (melfalano).

4.2 Mobilização das CTHs

Quanto à mobilização, 74 (69,15%) pacientes responderam de modo eficiente à mobilização celular da medula para o sangue periférico e, 33 (30,85%) tiveram falha, sendo caracterizados como mau mobilizadores. Destes, 14 (42,42%) foram submetidos a segundo protocolo de mobilização, alcançando-se sucesso em 6 (42,85%) pacientes e falha em 8 (57,15%) (Figura 5).

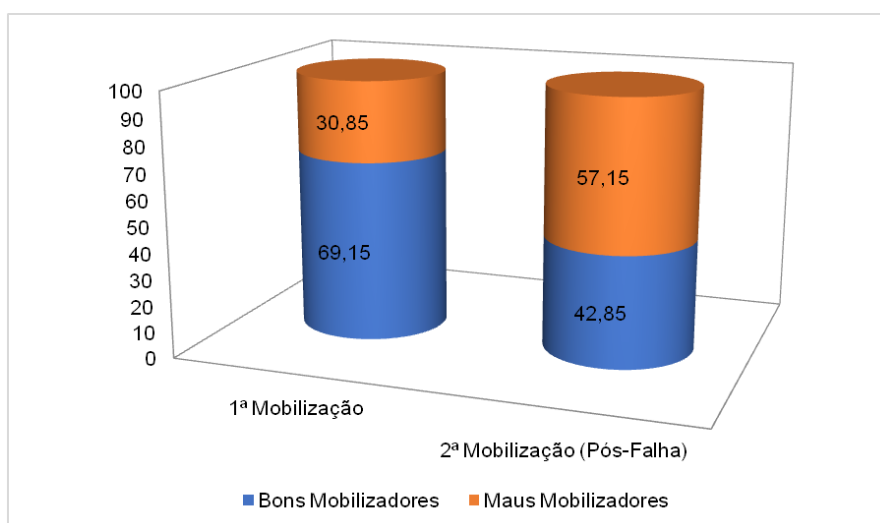


Figura 5- Gráfico demonstrando desempenho de mobilização.

Avaliou-se a contagem de CTHs no sangue periférico (CD34 pré) em relação ao “esquema de estímulo” (G-CSF). Os dados apresentaram distribuição assimétrica, portanto utilizou-se como medida de tendência central a mediana e semi-amplitude interquartílica, onde CD34+ pré apresentou mediana de 40,59 (17,40 – 84,82). Na estratificação pelo esquema de estímulo, obtivemos três grupos a saber: Filgrastima 40,63 (20,00 - 82,19); Plerifaxor 33,18 (33.09 - 33.28) e Filgrastima+Vinorelbina 70,28 (39,24 - 114,11). Através do teste de *Kruskal-Wallis*, obteve-se um valor de $p= 0.02251$, significativo estatisticamente (Figura 6).

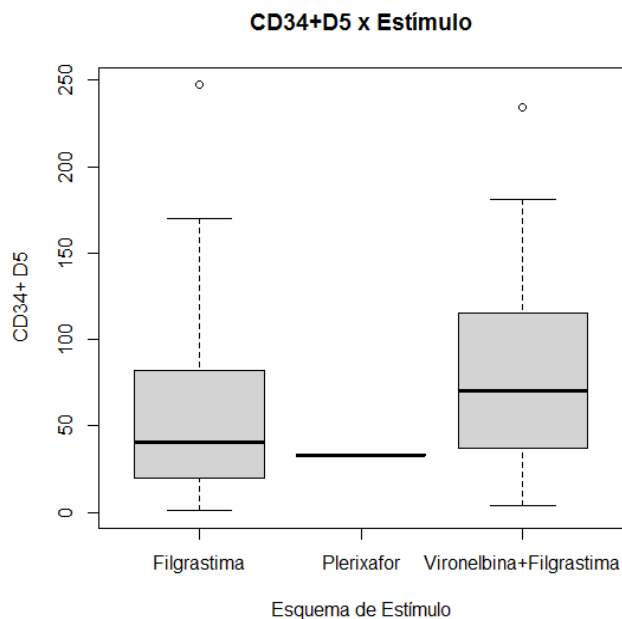


Figura 6- Boxplot do esquema de estímulo em relação ao CD34_pré.

O esquema Plerixafor possui “n amostral” pequeno, apenas dois pacientes, podendo assim influenciar na análise estatística. Por este motivo, realizamos nova análise retirando o esquema supracitado, utilizando o teste de *Mann Whitney* para analisar os demais esquemas (Filgrastima e Vinorelbina+Filgrastima), e obtivemos diferença com significância estatística entre os grupos ($p\text{-value} = 0.008806$) (Figura 7).

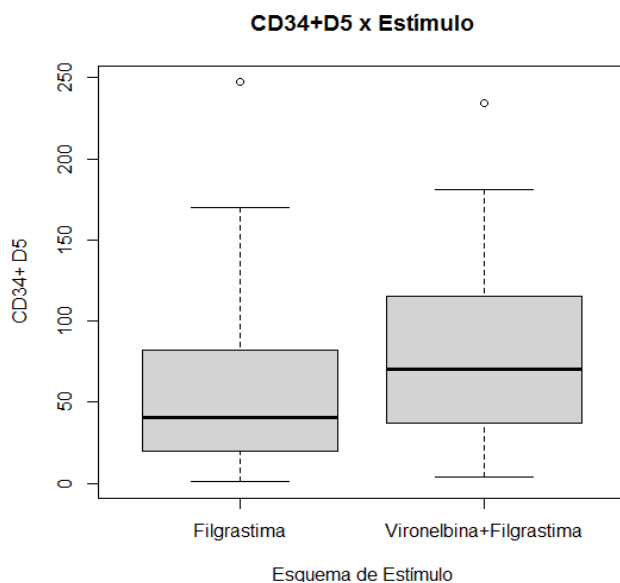


Figura 7 - Boxplot do esquema de estímulo em relação ao CD34+ pré ($p\text{-value} = 0.008$). Os resultados demonstram que níveis mais elevados de CTH são

mobilizados para o sangue periférico quando adotada a associação de vinorelbina com filgrastima.

4.3 Quantificações de CD34+ do sangue periférico

Com o intuito de identificar no conjunto de dados completo, visando identificar preditores de eficiência da aférese, foram realizadas análises de *Machine Learning*. Nesta avaliação, o principal preditor para eficiência da aférese foi o CD34⁺ do sangue periférico pré-aférese. A quantificação de CD34⁺ por citometria de fluxo é internacionalmente reconhecida como melhor preditor do ideal momento da coleta. Desta forma, esses resultados demonstram o adequado desempenho que temos obtido em nosso serviço.

Avaliando este preditor e, com o intuito de estabelecer valores de corte diretamente relacionados com o desempenho ideal da aférese, aplicou-se o algoritmo J48 (software Weka), resultando em uma árvore de decisão preditiva, baseada nos valores de CD34⁺ periférico (CD34 pré), indicando eficiência de obtenção de níveis superiores a $2,5 \times 10^6$ /kg de peso do paciente quando a contagem de CD34 pré for $>23/\mu\text{L}$, indicando alta probabilidade de a coleta ser eficiente. Já valores de CD34 pré $\leq 23/\mu\text{L}$ indicam menor probabilidade de eficiência na aférese, conforme demonstrado na figura 8 abaixo. Nesta análise, a AUC foi igual a 0,919.

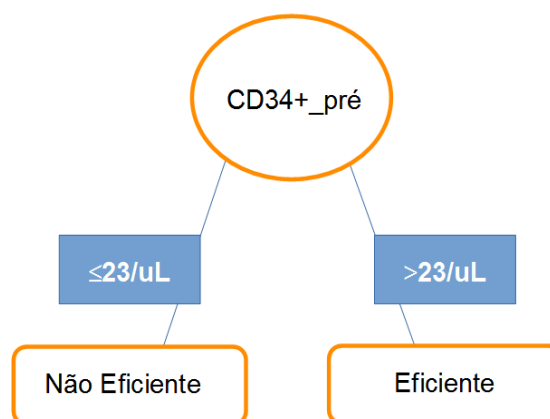


Figura 8- Árvore de decisão obtida pela aplicação do algoritmo J48.

A quantificação de CD34+ periférico é o melhor parâmetro preditor para determinar o momento ideal da coleta. No entanto, a árvore de decisão desenvolvida neste estudo pode auxiliar na conduta clínica, visto que os valores de corte definidos apresentam correlação positiva com a eficiência da aférese. Desta forma, este pode ser um indicador de qualidade a ser adotado no serviço.

Com relação ao número de CTHs obtidas no produto da aférese, considerando valores de CD34+ acima de $2,5 \times 10^6$ /kg peso como eficientes e, abaixo como ineficientes, procedeu-se a análise da associação da eficiência da aférese com os níveis de CD34+ periféricos no dia da coleta (CD34 pré) (figura 9). Encontramos correlação estatisticamente significativa nestes parâmetros ($p < 0,0001$).

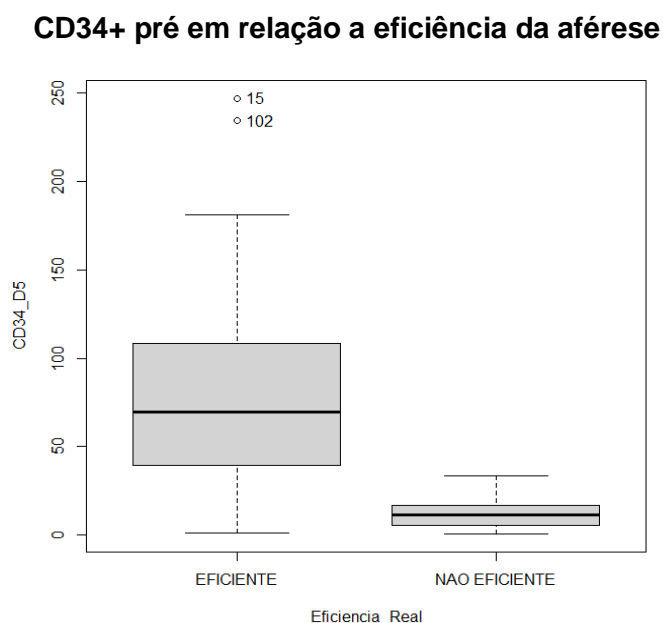


Figura 9- Boxplot de CD34+ pré agrupado pela eficiência da aférese.

Buscando identificar no conjunto completo de dados dos pacientes submetidos à coleta de CTH variáveis quantitativas associadas com eficiência da aférese, procedeu-se à Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando o pacote factoextra do software R.

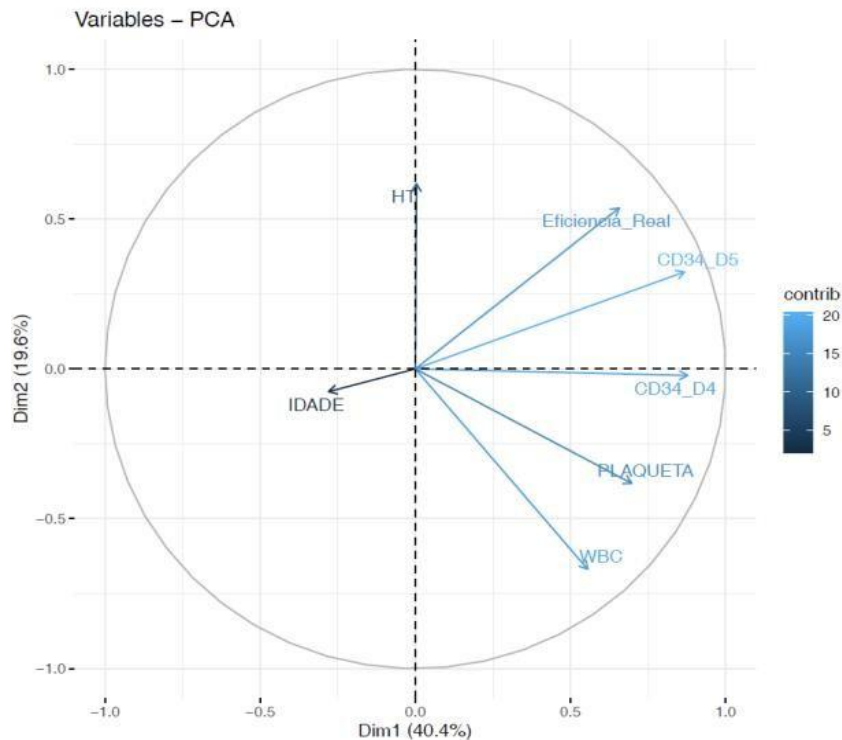
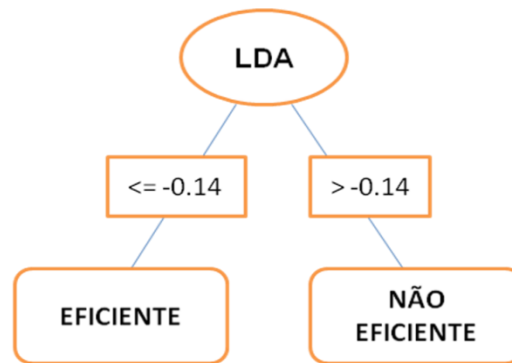


Figura 10 - Análise de Componentes Principais utilizando o pacote factoextra software R.

Essa análise mostrou que as duas variáveis que apresentam maior correspondência com a eficiência da aférese são CD34+ pré e hematócrito (Ht). Dessa maneira, foi utilizada a Análise de Discriminante Linear (LDA) para elaborar uma equação (*score*) para predição da eficiência, utilizando o pacote MASS do software R.

A LDA mostrou que combinação de CD34 pré e Ht resultaram na melhor associação de variáveis para predizer a eficiência da aférese, permitindo a obtenção de uma função matemática (modelo), combinando valores absolutos de CD34+ pré e Ht, o qual pode ser aplicado especialmente quando os valores de CD34+ estiverem menores que 23. Se o resultado da equação for $\leq -0,14$ a probabilidade de eficiência na coleta é maior, no entanto se $> -0,14$ a probabilidade de eficiência é baixa (Figura 11). A LDA é uma técnica exploratória que executa combinações lineares de atributos e determina equações discriminantes por balancear os coeficientes da equação em uma via autônoma para maximizar a performance da equação em classificar aféreses eficientes e não eficientes.



$$\text{LDA_SCORE} = 0,009210655 \times \text{HT} - 0,022568086 \times \text{CD34_D5}$$

(AUC = 0,916)

Figura 11 - Análise de Discriminante Linear

A análise de LDA associando os atributos possibilita aumentar a performance preditiva da eficiência da aférese quando os níveis de CD34+ pré estão $<23/\mu\text{L}$. Aplicamos a equação em pacientes que tiveram a quantificação de CD34+ pré $\leq 23/\mu\text{L}$, porém coletaram o valor esperado de $\geq 2,5 \times 10^6/\text{kg}$, e do total de quatro pacientes, três (75%) obtiveram resultado efetivo de $\leq -0,14$, ou seja, usando o modelo, a predição da eficiência da aférese poderia ser realizada de modo satisfatório.

Esta função matemática é mais um parâmetro que pode ser implementado como indicador de qualidade.

Abaixo, bloxplot relacionando o modelo LDA com a eficiência ou não eficiência da aférese ($p < 0,0001$) (Figura 12).

Modelo LDA em relação a eficiência da aférese

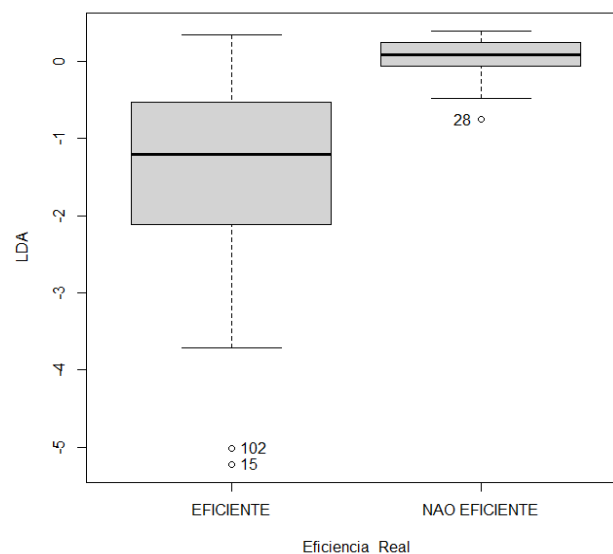


Figura 12 – Boxplot relacionando o modelo LDA com a eficiência ou não eficiência da aférese.

Vale ressaltar que os valores de hematócrito contribuem na predição apenas se associado ao CD34 (AUC=0,916). Se avaliado individualmente, o Ht não apresenta-se relevante ($p= 0.2899$) (Figura 13).

Hematócrito em relação a eficiência da aférese

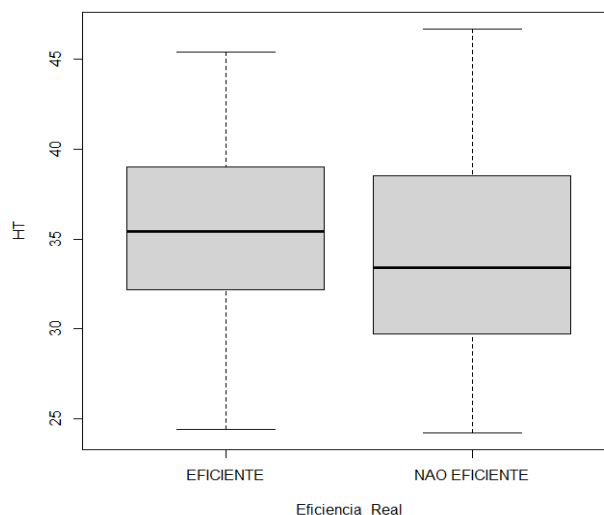


Figura 13 – Boxplot relacionando Ht com eficiência ou não eficiência da aférese.

Quando analisou-se a relação do nível de CTHs periféricas obtido nas diferentes patologias, observou-se não haver influência do tipo de doença na mobilização celular, resultando o valor de $p = 0.09052$ (Figura 14). Dados apresentam distribuição assimétrica, portanto são representados pela mediana e semi-amplitude interquartílica: Linfoma de Hodgkin (LFH) 50,66 (19,37-82,22); Linfoma não Hodgkin (LNH) 19,82 (9,24-37,70); Mieloma Múltiplo (MM) 51,87 (17,72-96,59) e Neoplasia Maligna de Testículo Tópico (NMTT) 41,07 (apenas um paciente).

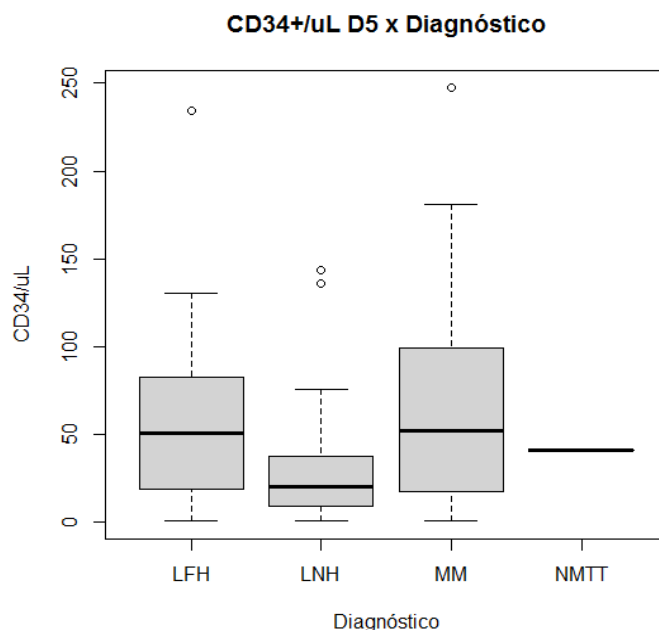


Figura 14 - Boxplot de CD34+ pré em relação ao diagnóstico.

4.4 Coleta de CD34+ na aférese

Quanto à coleta de CTH por aférese, dos 107 pacientes atendidos, 17 falharam na mobilização, restando 90 pacientes que deram continuidade ao processo e foram submetidos a coleta por aférese, destes 76 (84,44%) obteve-se nível ideal, superior a $2,5 \times 10^6$ /Kg/peso do paciente, na primeira coleta. No entanto, 13 (14,44%) necessitaram de coleta suplementar no dia posterior e 8 (8,88%) precisaram ser submetidos à segunda mobilização para tentativa de nova coleta, a qual foi eficiente em 5 indivíduos (62,5%).

No que tange o diagnóstico dos pacientes, avaliamos a sua relação com o produto de aférese, através do teste de *Kruskal-Wallis*, resultando um valor de $p=0.5955$, não significativa estatisticamente, ou seja, os tipos de patologia não têm influenciado na obtenção de CHP na leucaférese. Os dados apresentam distribuição assimétrica, portanto são representados pela mediana e semi-amplitude interquartílica: LFH 4,75 (3.11 - 6.24); LNH 3,75 (2.87 - 5.13); MM 5,17 (2,68 – 8,45) e NMTT 7,44 (7,44 – 7,44) (Figura 15).

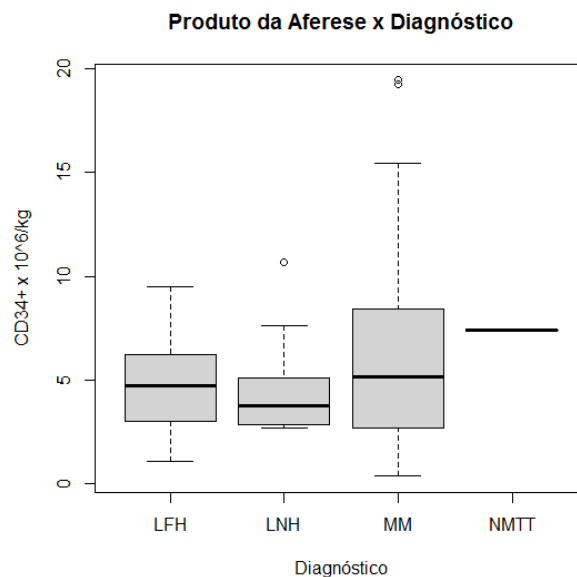


Figura 15 - Boxplot do produto da aferese em relação ao diagnóstico.

Cabe ressaltar que o objetivo da coleta influencia nesta análise, visto que em algumas patologias o valor alvo de CD34 na coleta deve ser maior. Por exemplo, para pacientes com NMTT se faz necessária coleta dupla, ou seja, o valor alvo deve ser $\geq 5 \times 10^6/\text{Kg}$ para ser dividido em duas bolsas contendo pelo menos $2,5 \times 10^6/\text{Kg}$ cada, viabilizando o transplante sequencial (*tandem*).

4.5 Enxertia Medular

A mediana de enxertia medular foi de 12 dias em nossos pacientes. Na avaliação do tempo da enxertia medular (pega da medula) e a quantidade de CD34+ no produto da aferese, observou-se relação inversamente proporcional, pois quanto maior a concentração de CD34+ na coleta, menor o tempo de enxertia ($p < 0,001$ teste de *Mann Whitney*). A mediana de enxertia medular foi de 12 dias, e a mediana do produto da aferese foi de $4,65 \times 10^6/\text{Kg}$. Através da mediana do valor de aferese fez-se uma divisão em dois grupos, sendo grupo 1: CD34+ $< 4,65$, grupo 2: CD34+ $\geq 4,65$ (Figura 16).

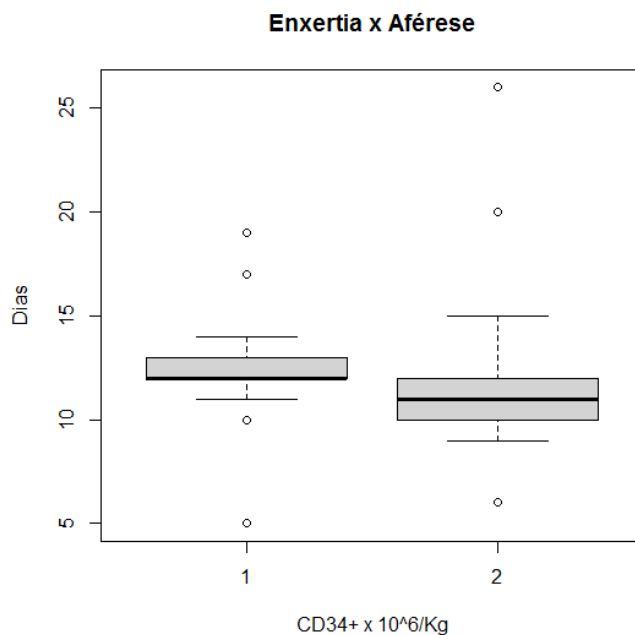


Figura 16 - Boxplot da enxertia medular em relação ao produto da aférese.

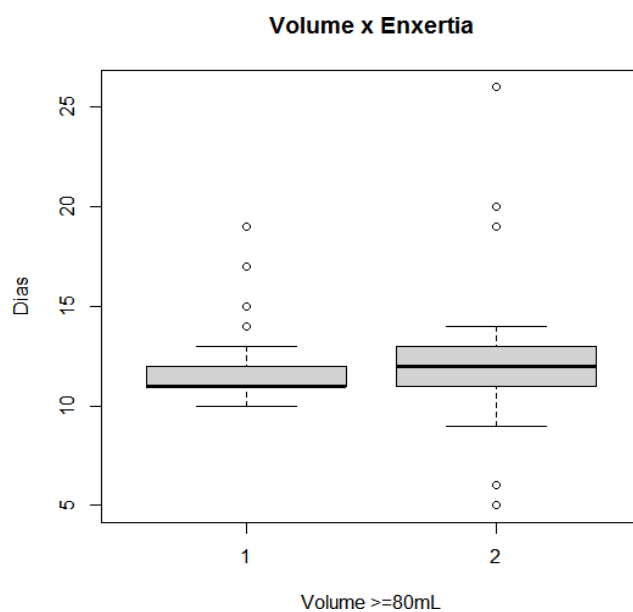


Figura 17- Boxplot da enxertia medular em relação ao volume da bolsa de aférese.

No comparativo entre a enxertia medular e o volume da aférese (mL), o teste *Mann Whitney* demonstrou não haver significância estatística ($p= 0.9667$), ou seja, o volume (mL) obtido na leucaférese não tem relação com o tempo da pega da medula (Figura 17). De igual forma, através da mediana do volume, 80mL, dividimos em dois grupos, sendo esses: Grupo 1 ≥ 80 mL e Grupo 2 < 80 mL.

4.6 Eficiência

Para determinação do volume de sangue total a ser coletado na aférese, faz-se o cálculo de estimativa de coleta, baseado no valor de CD34 periférico do dia, considerando coletar em nosso serviço, minimamente 30% de CD34+ circulante. Segue a fórmula do cálculo de estimativa da coleta, que visa determinar o volume total de sangue (VST) a ser coletado na leucaférese.

$$\text{VST: } \frac{\text{CD34 alvo x } 10^6/\text{Kg}}{\text{CD34 periférico do dia}} \times \frac{\text{Peso do paciente}}{\text{Estimativa de coleta}}$$

Considerando coletar o percentual mínimo de 30% das células CD34 periféricas, no total de 99 aféreses realizadas, em 80 (80,8%) houve superação da estimativa de 30%.

Aplicando-se a fórmula do coeficiente de eficiência (CE), que considera a quantidade de CD34 obtida no produto da aférese x 100, dividido pelo CD34 periférico multiplicado pelo volume de sangue total processado, que pode ser realizada ao final da aférese, observamos que a eficiência real obtida tem sido maior, superando a estimativa de 30%.

$$\text{CE: } \frac{\text{CD34 aférese x } 10^6/\text{Kg}}{\text{CD34 periférico do dia}} \times \frac{100}{\text{VST processado}}$$

Ao realizar a análise de CE por ano, através do teste de *Kruskal-Wallis*, obtivemos um p-value não estatisticamente significativo, no entanto, com tendência à significância ($p= 0.05585$). Os dados possuem distribuição assimétrica, diante disso usamos mediana e semi-amplitude interquartilica: **2016** 0,34 (0,27 – 0,43); **2017** 0,43 (0,34 – 0,58); **2018** 0,47 (0,38 – 0,58); **2019** 0,45 (0,37 – 0,64) e **2020** 0,59 (0,40 – 0,78).

Diante deste comportamento biológico, utilizamos o teste pós-roc de Dunn, obtendo significância na comparação em 2016 vs 2020 (Figura 18), demonstrando aumento da eficiência do serviço no ano de 2020 comparado a 2016, ano de início das atividades.

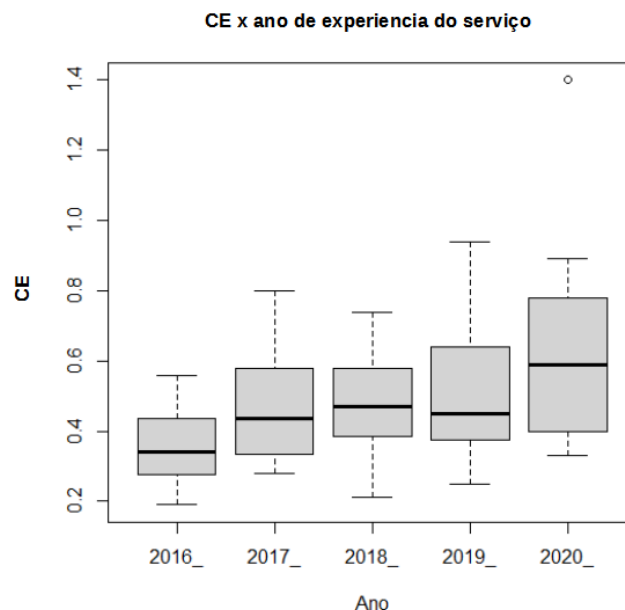


Figura 18 – Boxplot comparando CE por ano de serviço

Fizemos também análise intergrupos (dois a dois, em diferentes combinações), utilizando o teste de *Mann Whitney* e apresentaram significância as comparações entre 2016 vs 2018 ($p=0,04$), 2016 vs 2019 ($p=0,03$) e 2016 vs 2020 ($p=0,009$).

Estes resultados nos permitem sugerir adotar o cálculo de CE no serviço, como um indicador de qualidade da leucaférese. Além disso, considerando as medianas dos anos de atividade do serviço de transplante, podemos incrementar o cálculo de estimativa de aférese, atualmente padronizado em 30%. Como temos obtido rendimentos mais elevados, sendo que desde 2017 os níveis superam os 40% e, no último ano atingimos a mediana de 59%, com valores mínimos e máximos de 40 e 78% respectivamente, podemos sugerir a adoção do índice de 40% na estimativa da aférese.

Em junho de 2020 tivemos troca de equipamento da aférese, de Spectra Optia® (marca Terumo) para COM.TEC® (marca Fresenius). Comparamos os coeficientes de eficiência (CE) obtidos nas leucaféreses dos dois equipamentos. Desta análise a mediana e a semi-amplitude interquartílica dos equipamentos foram: Spectra Optia 0,45 (0,36 - 0,58) e Fresenius 0,60 (0,38 - 0,71). Ao comparar o CE em relação aos equipamentos, através do teste de *Mann Whitney* obtivemos um $p=0.2029$, não significativo estatisticamente (Figura 19), demonstrando não haver influencia do equipamento na eficiência da aférese.

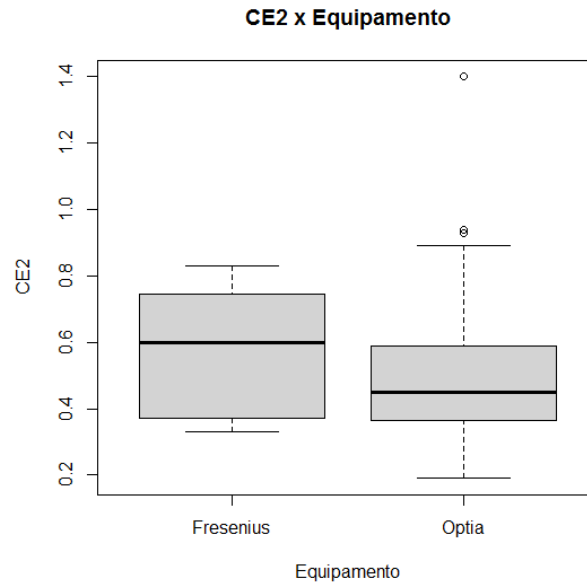


Figura 19 – Boxplot comparando o CE dos equipamentos de aférese.

Ao realizar a análise de comparação de CE por tipo de diagnóstico, utilizando *Kruskal-Wallis*, obtivemos o valor de $p= 0.6396$, sem significância estatística (Figura 20). A distribuição dos dados é assimétrica (valores de mediana e semi-amplitude interquartílica): **LFH** 0,54 (0,38 – 0,63); **LNH** 0,45 (0,35 – 0,58) **MM** 0,45 (0,37 - 0,61) **NMTT** 0,61 (0,58 - 0,64). De igual forma analisamos o delta do CE (CE subtraído da estimativa da coleta) avaliando em relação às diferentes patologias (diagnóstico), não obtendo valor significativo estatisticamente ($p=0.7078$) demonstrado na figura 21.

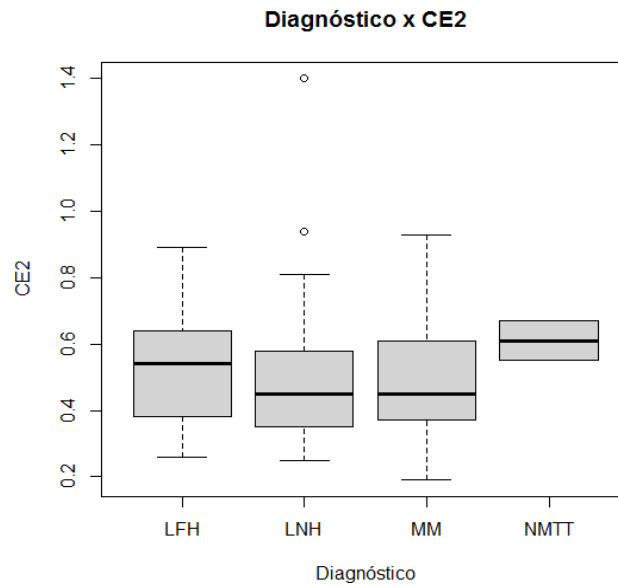


Figura 20 – Boxplot comparando CE com os diagnósticos

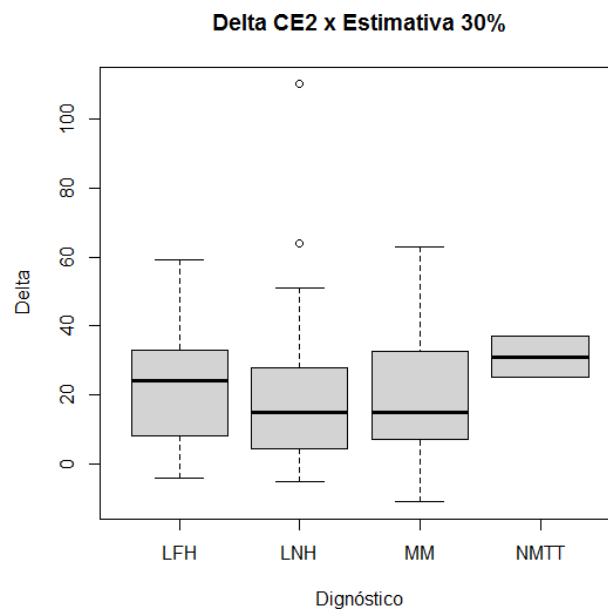


Figura 21 – Boxplot comparando Delta CE com os diagnósticos.

Estes dados demonstram que o tipo de patologia não tem impactado na eficiência de coleta de CTHs pela aférese.

5. DISCUSSÃO

A mensuração da quantidade de células CD34+ tanto para predição do momento ideal de realizar a coleta quanto para avaliar a qualidade do produto de CTH coletado do sangue periférico, caracteriza-se como parâmetro fundamental na prática clínico-laboratorial no processo de transplante de células progenitoras hematopoiéticas.

Quando implantado o serviço de TMO no Hospital das Clínicas de Botucatu foram estabelecidos como valores-alvo: CD34 periférico ≥ 20 células viáveis/ μL para caracterização do momento ideal da aférese e, $\text{CD34} \geq 2,5 \times 10^6/\text{kg}$ de peso do paciente no produto da aférese para infusão, ou seja, realização do transplante.

Com base nesses valores estabelecidos a análise dos dados completos comprovou que o melhor preditor de eficácia do Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas de Botucatu é o valor de CD34+ no sangue periférico. Nossos resultados apenas confirmam o que já está estabelecido na literatura, demonstrando a qualidade do serviço e a relevância do uso deste indicador (KUDSEM et al., 2001; FONTAO-WENDEL et al., 1999; FORD et al., 2003).

Para obtenção de quantidade mínima de células CD34+ no sangue periférico, as CTH precisam ser mobilizadas do compartimento medular para a circulação. Esta mobilização pode ser obtida através de administração isolada ou conjunta de fatores de crescimento hematopoéticos com quimioterapia mielossupressora. A administração associada é o modo mais eficiente de recrutamento de CTH. Deste modo, este regime de mobilização tem sido o mais utilizado em transplantes autólogos (MENDRONE, 2008).

De acordo com o tipo de mobilização que se é utilizada a contagem de CD34+ no sangue periférico pode variar (GIDRON et al., 2005; GERTZ, 2010). Nossas análises demonstraram diferença quando analisamos pacientes que foram mobilizados apenas com o uso G-CSF quando comparados àqueles que fizeram uso de quimioterápico suplementar ao G-CSF. Estes resultados estão de acordo com dados reportado por grupo suíço em 2015 (SAMARAS et al., 2015).

A infusão de concentrações adequadas de CTH está associada a 95% de probabilidade de promoção e recuperação hematopoética em transplantes autólogo (MENDRONE, 2008).

O pico de migração de células CD34⁺ nos pacientes que possuem neoplasias hematológicas ocorre, em geral, no 5º dia de administração das drogas mobilizadoras. Dessa maneira as instituições programam o início da coleta para esse dia (GRIGG et al., 1995). De igual maneira a diversos estudos, encontramos que o CD34⁺ periférico está correlacionado de maneira positiva com o CD34⁺ coletado na aférese, demonstrando a eficiência do serviço do HCFMB (ARMITAGE et al., 1997; KUDSEM et al., 2001; FONTAO-WENDEL et al., 1999; FORD et al., 2003).

A literatura sugere que seja realizada coleta quando os níveis de células CD34⁺ periféricas forem superiores a 20 células/ μ L, o que resulta em melhor rendimento da coleta. Nossos resultados, obtidos na análise de *Machine Learning* mostram que valores superiores a 23 células/ μ L estão correlacionados a valores superiores a $2,5 \times 10^6$ /Kg de peso. Segundo Armitage (1997) 94% das leucaféreses apresentam contagem igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células CD34⁺/(kg de peso) na coleta quando os valores de CD34 no sangue periférico estão superiores a 20 células/ μ L. De maneira contrária, concentrações inferiores a 10 células/ μ L são comumente relacionadas a coletas ruins, e, portanto, indicando a necessidade de coletas sequenciais, até que o valor adequado de CTH seja suficiente para infusão (REMES et al., 1997; KNUDSEN et al., 1998; NOGA et al., 2001).

Em nossas análises constatamos o benefício da associação do hematócrito (Ht) à contagem de CD34⁺ pré, aumentando o poder de predição da eficiência da aférese, especialmente quando a contagem de CD34 for ≤ 23 / μ L. Do total de pacientes que tiveram CD34⁺ abaixo de 23/ μ L, quando aplicada a equação matemática, foi possível prever eficiência da aférese em 75% das coletas. Desta forma, esta equação pode ser adotada como indicador de qualidade, favorecendo a predição daqueles que seriam considerados como ineficientes. Rocha e colaboradores (2020) validaram uma fórmula que prevê os rendimentos de coleta de CD34⁺, sendo útil para determinação do tempo ideal de leucaférese (ROCHA et al., 2020). No entanto, a associação de CD34

ao hematócrito, descrita em nosso trabalho, tem caráter inédito, especialmente utilizando-se análises de LDA. Relatos na literatura não encontraram associação relevante de valores de Ht, contagem de plaquetas e leucometria com os níveis de CD34+ no sangue periférico (SARKODEE-ADDOO et al., 2003; MEHTA et al., 2001). De fato, quando avaliamos o hematócrito como parâmetro isolado este não apresentou relevância em predizer a eficiência da coleta. Em contrapartida, Pornprasertsud e colaboradores sugeriram que os níveis de hematócrito antes da administração do G-CSF e no momento de início da leucaférese, foram importantes preditores na eficiência da coleta de CD34+ (PORNPRASERTSUD et al., 2015).

Quando avaliamos a eficiência da leucaférese no nosso serviço, observamos que 84,44% dos pacientes obtiveram níveis ideais na primeira coleta de CTH. Apenas 14,44% necessitaram de segunda coleta no dia posterior. Estes índices estão de acordo com a literatura. Em estudo realizado por Samaras e colaboradores (2015) foi reportado que em 77% dos pacientes a quantidade predefinida de CTH foi obtida em primeira leucaférese e 20% deles necessitaram de uma segunda coleta.

Em pacientes submetidos ao TCTH-auto, estudo anterior aponta mediana de 12 dias para enxertia medular (WEAVER et al., 1995). Nossos resultados estão de acordo, visto que obtivemos mesma mediana de tempo de enxertia medular. Estudos apontam relação entre a quantidade de células CD34+ infundidas com a pega medular (WEAVER et al., 1995), ratificando que a cinética do enxerto esta atrelada ao número de CD34+ infundidas no transplante. Os pacientes avaliados no presente estudo que receberam infusão superior a $4,65 \times 10^6/\text{kg}$ de CD34+, tiveram menor tempo de estabelecimento de enxertia (mediana de 11 dias). Ao passo que aqueles que receberam infusão inferior a $4,65 \times 10^6/\text{kg}$ de CD34+, tiveram pega de medula em 12 dias.

Ao aplicar o cálculo do coeficiente de eficiência (CE) nos dados obtidos dos pacientes do nosso serviço, observamos índices progressivamente maiores conforme os anos de experiência do serviço de transplante. Além disso, comparando-se ao cálculo de estimativa de coleta, observou-se que temos superado os valores estimados, o que nos permite sugerir o aumento deste valor estimado, assim como o uso do CE como indicador de qualidade.

As medianas de CE obtidas foram de 34% (2016), 43% (2017), 47% (2018), 45% (2019) e 59% (2020). Estes resultados corroboram com dados da literatura. AKIL (2018) obteve média de 50,51% de CE no serviço avaliado. Já KINDWALL-KELLER (2014) publicou dados de CE variando de 30 a 70%.

A respeito ainda do coeficiente de eficiência, analisou-se a performance dos equipamentos utilizados no serviço no período deste estudo, onde não observou-se diferença estatisticamente significativa de rendimento da coleta, no entanto, evidencia-se uma tendência de melhor desempenho no equipamento da Fresenius®. Ressalta-se que o número de coletas feitas neste equipamento é, até o momento, inferior ao realizado no aparelho da Optia®, podendo ter influenciado nas análises estatísticas. Porém, em trabalho publicado por Solmaz e colaboradores (2018), os resultados são contrários. Eles relataram coeficiente de eficiência maior nos produtos de aférese obtidos na Optia quando comparados aos obtidos na Fresenius (SOLMAZ, 2018).

Diante do exposto, foram elencados neste estudo três indicadores de qualidade que podem ser adotados no serviço visando monitorar a qualidade do processo de transplante de células-tronco hematopoéticas, com vistas à excelência.

O melhor indicador, já bem consolidado na literatura e, reafirmado neste estudo avaliando nossos pacientes, é a contagem de CD34+ em sangue periférico. No entanto, estabelecemos valores de corte para aumentar a capacidade de predição do momento ideal da coleta, dada a correlação positiva de CD34 pré e a eficiência da aférese. Desta forma, a contagem de CD34+ pré caracteriza um indicador de qualidade a ser adotado no serviço.

Além disso, desenvolvemos um modelo matemático útil à predição da eficiência da aférese, através da associação de CD34 pré e valores de Ht, especialmente para os casos em que o CD34 pré está abaixo de 23/uL. Esta função matemática é mais um parâmetro que pode ser implementado como indicador de qualidade.

Outro parâmetro que mostrou-se relevante foi o cálculo de CE, pois reflete a real eficiência da aférese obtida e permite inferir sobre o desempenho das etapas do processo do TCTH-auto, sendo um importante indicador de qualidade para estabelecer metas futuras, sempre visando a qualidade total do serviço.

Como perspectivas futuras, estes indicadores de qualidade podem ser implementados e validados no serviço, servindo de modelo para o estabelecimento de outros indicadores de forma a contemplar o monitoramento de todas as etapas do TCTH-auto do HCFMB.

6. CONCLUSÃO

Uma vez realizado o estudo, com a coleta de dados e processamento dos mesmos, foi possível identificar indicadores que asseguram a qualidade do processo laboratorial de TCTH-auto e que possam ser implementados e validados no serviço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

- ✓ Valores de CD34+ pré $>23/\mu\text{L}$.

- ✓ Função matemática para predição da eficiência de aférese utilizando CD34+ pré e hematócrito.

- ✓ Cálculo do Coeficiente de eficácia, indicando a qualidade da aférese.

7. REFERÊNCIAS

AFIFI, S *et al.* Upfront plerixafor plus G-CSF versus cyclophosphamide plus G-CSF for stem cell mobilization in multiple myeloma: efficacy and cost analysis study. **Bone Marrow Transplant**, v. 51, p. 546–52, 2016.

AKIL, F. **Avaliação da estratégia de coleta de células progenitoras hematopoiéticas em dias subsequentes para transplante autólogo em pacientes com patologias hematológicas.** Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 2018.

ARMITAGE, S. *et al.* CD34⁺counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. **Bone Marrow Transplant**, v. 20, p.587–591, 1997.

AZEVEDO, W. RIBEIRO, M.C.C. Fontes de células-tronco hematopoiéticas para transplantes. **Revista USP**. v.33, n.4, p.381-389 , 2000.

BABIC, A., EUGENIA, T. **Cell Source and Apheresis.** In book: The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses, pp.71-87, 2018.

BALDOMERO H, *et al.* The EBMT activity survey2009: trends over the past 5 years. **Bone Marrow Transplant**, v. 46(4), p. 485–501, 2011.

BEGLEY CG *et al.* Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils *in vitro*: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. **Blood**, v. 68, p.162-166,1986.

BITTAR, O. Indicadores de qualidade e quantidade em saúde. **RAS**, v. 3, n. 12 – Jul-Set, 2001.

BOGLARKA G., BRENDA M. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. **Blood**, v.124 (3), p. 344–353, 2014.

BURGESS AW, METCALF D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. **Int J Cancer**, v.26, p. 647-54, 1980.

CARRERAS, E. *et al.* **The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies.** 7^o edição. Springer International Publishing, 2019.

CARVALHO, C. C. de; GOLDENBERG, R. C. dos S. **Células-tronco Mesenquimais.** 1^o edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

CASTRO JUNIOR CG. **Análise clínica e epidemiológica do transplante de medula óssea no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** 2002. Dissertação-Programa de Pós Graduação em ciências médicas: Pediatria. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.

CORGOZINHO M. M., GOMES J.R.A.A., GARRAFA V. Transplantes de Medula Óssea no Brasil: Dimensão Bioética. Ed. 22. **rev.latinoam.bioet**, v.12, N.1, p. 36-45, 2012.

DELAMAIN, M. **Correlação entre a quantidade de células CD34+ circulantes e a coleta por aférese de CPP em pacientes onco-hematológicos.** 2004. Dissertação - (Mestrado em Ciência Médica) Universidade Estadual de Campinas, Programa de Ciências Médicas do Departamento de Medicina, Campinas, 2004.

DESSEN. E. M. B., MINGRONI-NETTO, R. C. **Desvendando as células-tronco: dos sonhos à realidade.** 2007. Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FONTAO-WENDEL, R *et al.* The absolute number of circulating CD34+ cells as the best predictor of peripheral hematopoietic stem cell yield. **J Hematother.**, v.8, p. 255-62, 1999.

FORD, C.D *et al.* An evaluation of predictive factors for CD34+ cell harvest yields from patients mobilized with chemotherapy and growth factors. **Transfusion**, v. 43, p.622-5, 2003.

GASPER, P.W. The hemopoietic system. In: FELDMAN, B.F. *et al.* Schalm's veterinary hematology. **Williams & Wilkins**, Cap.11, p.63-68, Philadelphia 2000.

GATTI, L. **Revisão sistemática de literatura em células-tronco hematopoiéticas: implicação da metodologia de criopreservação.** 2019. Dissertação de mestrado em Hemoterapia. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2019.

GERTZ, M.A. Current status of stem cell mobilization. **British Journal of Hematology**, v.150, p.647-662, 2010.

GIDRON, A *et al.* Can the stem cell mobilization technique influence CD34+ cell collection efficiency of procedures in patients with hematologic malignancies. **Bone Marrow Transplant**, v. 35, p. 243-6, 2005.

GRATAMA, J.W *et al.* Flow cytometry enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. **Cytometry**, New York, v.34, n.3, p.128-142, 1998.

HENIG, I; ZUCKERMAN, T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v.5(4), p.1-15, 2014.

HU B, YASUI K. Effects of colony stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammations site. **Int J Hematology**, v.66, p.179-88, 1997.

HERZOG, E.L *et al.* Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, New York, v.102, n.10, p. 3483-3493, 2003.

JACOBSON, L.O *et al.* Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine.**, v. 34, p.1538 – 1543, 1949.

JANSEN J, HANKS S, THOMPSON M, DUGAN MJ, AKARD LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from peripheral blood. **J Cell Mol Med**, v. 9(1), p.37-50, 2005.

KHADDOUR K., HANA C.K., MEWAWALLA P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **StatPearls**, 2020.

KESSINGER, A., SHARP, JG. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. **Bone Marrow Transplant.**, v.31, p.319- 29, 2003.

KINDWALL-KELLER, T. Peripheral stem cell collection: from leukocyte growth factor to removal of catheter. **J Clin Apher**, v. 29, p.199-205, 2014.

KORBLING, M., ANDERLINI, P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?. **Blood**, v.98(10), p. 2900–2909, November, 2001.

KOEPSSELL, S. A.; JACOB, E. K., MCKENNA JR, D.H. The collection and processing of hematopoietic stem cells. **Technical manual**, p.713-728, 2014.

KNUDSEN LM, GAARSDAL E, JENSEN L, NIKOLAISEN K, JOHNSEN HE. Evaluation of mobilized CD34+ cell counts to guide timing and yield of large-scale collection by leukapheresis. **J Haematother**, v. 7, p. 45-52, 1998.

KNUDSEN LM, NIKOLAISEN K, GAARSDAL E, JOHNSEN HE. Kinetic studies during peripheral blood stem cell collection show CD34+ cell recruitment intra-apheresis. **J Clin Apheresis**, v.16, p. 114–119, 2001.

LEMOS N. E *et al.* Quantification of peripheral blood CD34 + cells prior to harvesting of stem cells by leukapheresis: a unique experience at the center. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40(3), p. 213-218, 2018.

LORENZ, E *et al.* Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. **Journal of the National Cancer Institute**, v.12, p.197–201, 1951.

MAKAR S. R *et al.* Use of laboratory tests to guide initiation of autologous hematopoietic progenitor cell collection by apheresis: results from the

multicenter hematopoietic progenitor cell collection by Apheresis Laboratory Trigger Survey. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 28(4), p.198-204, Oct, 2014.

MENDRONE J. A. **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.** 2008. Tese de Doutorado (Processos Imunes e Infecciosos). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

MEHTA, J *et al.* CD34⁺ cell collection efficiency does not correlate with the pre-leukapheresis hematocrit. **Bone Marrow Transplant**, v. 28, p. 597– 601, 2001.

MILONE, G *et al.* G-CSF alone vs cyclophosphamide plus G-CSF in PBPC mobilization of patients with lymphoma: results depend on degree of previous pretreatment. **Bone Marrow Transplant**, v. 31(9), p.747–54, 2003.

MOOG, R. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells. **Curr Stem Cell Res Ther**, v.1, p.189–201, 2006.

NOGA SJ, VOGELSANG GB, MILLER SC, *et al.* Using point-of-care CD34 enumeration to optimize PBSC collection conditions. **Cytotherapy**, v. 3, p. 11-18, 2001.

OLIVEIRA C. A; MENDES M. E. **Gestão da fase analítica do laboratório:** como assegurar a qualidade na prática. 1ªEd. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010.

PEREZ-SIMON, J. A *et al.* Clinical significance of CD34⁺ cell dose in long-term engraftment following autologous peripheral blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 24, p. 1279–1283. 1999.

PIRELLI, L *et al.* 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. Società Italiana Di Emaferesi and Manipolazione Cellulare (SIDEM) and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). **Tranfusion**, v. 52, p. 893-905, April 2012.

PORNPRASERTSUD, N *et al.* The use of hematocrit level for predicting the efficiency of peripheral blood CD34⁺ cell collection after G-CSF Mobilization in Healthy Donors. **Journal of Clinical Apheresis**. v.30, p. 329-334, 2015.

PHELAN, R., ARORA, M., CHEN, M. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. **CIBMTR US summary slides**, 2020. Disponível: <http://www.cibmtr.org>. Acesso em: 12 dez. 2020.

REMES, K. MATINLAURI, I. GRENMAN, S *et al.* Daily measurements of blood CD34⁺ cells after stem cell mobilization predict stem cell yields and posttransplant hematopoietic recovery. **J Haematother**, v. 6, p. 13-19, 1997.

ROCHA, V *et al.* Validation of a formula predictive of peripheral blood stem cell yield and successful collection in healthy allogeneic donors. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v.42 p. 2, 2020.

SAMARAS, P *et al.* Efficacy of Vinorelbine Plus Granulocyte ColonyStimulation Factor for CD34^b Hematopoietic Progenitor Cell Mobilization in Patients with Multiple Myeloma. **American Society for Blood and Marrow Transplantation**, p.74-80, 2015.

SANTIS, G. C., PRATA, K. L. Criopreservação de células-progenitoras hematopoiéticas. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP**, Ribeirão Preto, v.42, n.1, p.36-47, jan./mar. 2009.

SANTOS GW. History of bone marrow transplantation. **Clin Haematol**, v.12, p. 611-639, 1983.

SARKODEE-ADOO, C *et al.* Influence of preapheresis clinical factors on the efficiency of CD34⁺ cell collection by large-volume apheresis. **Bone Marrow Transplantation.**, v.31, p. 851–855, 2003.

SOLMAZ, S *et al.* A Comparison of Fresenius Com.Tec Cell and Spectra Optia Cell Separators for Autologous and Allogeneic Stem Cell Collections: Single Center Experience. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v. 34(4), p.677–683, 2018.

SUTHERLAND, D.R *et al.* The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. **J Hematother**, n.5, v.3, p.213-26, 1996.

SCOTT MA, GORDON MY. In search of the haemopoietic stemcell. **Br J Haematology**, v. 90(4), p.738–431, 1995.

TIWARI, A.K *et al.* Autologous peripheral blood stem cell harvest: Collection efficiency and factors affecting it. **Asian Journal of Transfusion Science**, v.10, p.93-97, 2016.

THOMAS, E.D *et al.* Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 257, p. 491, 1957.

THOMAS, E.D. A history of haemopoietic cell transplantation. **British Journal of Haematology.**, v.105, p.330-339, 1999.

WEAVER, CH *et al.* An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. **Blood**, v. 86, p. 9-3961,

1995.

WELTE K, PLATZER E, LU L, GABRILOVE JL, LEVI E, MERTELSMANN R, *et al.* Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. **Proc Nat Acad Sci**, v.82, p.1526- 30, USA 1985.