

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS DO SANGUE PERIFÉRICO COMO SUPORTE HEMATOPOIÉTICO AUTÓLOGO DE QUIMIOTERAPIAS DE ALTA DOSE

I. Racional e Resultados

MARIA R.G. SILVA, J. L. PASSOS-COELHO, F. LEAL DA COSTA, M. ALEXANDRA MACHADO, NUNO MIRANDA, M. HELENA MIRANDA, ANTÓNIO PARREIRA
Unidade de Cuidados Hematológicos Intensivos (UCHI). Serviço de Hematologia. Instituto Português de Oncologia. Lisboa.

RESUMO

Neste artigo revemos os conceitos teóricos subjacentes à transplantação de PBPC e os resultados reportados na literatura com esta modalidade terapêutica. A quimioterapia de alta dose é frequentemente utilizada com o objectivo de aumentar a percentagem de remissões completas e, nalguns casos, de curas em doentes com neoplasias. A toxicidade hematológica desta estratégia é minimizada através da infusão de progenitores hematopoieticos autólogos. Actualmente, o sangue periférico constitui a fonte preferencial de progenitores, já que o enxerto de células progenitoras do sangue periférico (*peripheral blood progenitor cells*, PBPC) apresenta vantagens potenciais em relação ao enxerto de medula óssea, nomeadamente a maior rapidez de regeneração hematopoietica. Contudo, em condições basais, o número de progenitores clonogénicos (*colony-forming units granulocyte-macrophage*, CFU-GM) e de células CD34⁺ presentes no sangue periférico (parâmetros mais frequentemente usados na avaliação da celularidade do enxerto), é baixo. Torna-se por isso necessário aumentar o conteúdo de progenitores hematopoieticos no sangue periférico, pela administração de factores de crescimento hematopoietico e/ou quimioterapia citotóxica antes da colheita de PBPC, efectuada através de citaféreses realizadas em separadores celulares. As complicações da transplantação de PBPC associam-se com a mobilização, colheita e infusão do enxerto, além das toxicidades relacionadas com as altas doses de quimioterapia empregues antes da infusão.

SUMMARY

Use of Peripheral Blood Progenitor Cells as Autologous Hemopoietic support for High-Dose Chemotherapy. I. Rationale and Results

We review the rationale for PBPC transplantation and the results reported in the literature. In order to prolong complete remissions and increase cure rates, high-dose chemotherapy is frequently used in the treatment of selected neoplasias. Hematological toxicity can be overcome by the infusion of autologous hemopoietic progenitors. Recently, peripheral blood is being used as the preferred source for hemopoietic progenitors, since it allows faster hemopoietic recoveries when compared to progenitors harvested from bone marrow. An adequate graft is defined by its content in clonogenic progenitors (mainly CFU-GM) and CD34 positive cells; these two parameters need to be accurately determined by specific laboratory methods. PBPC grafts are harvested using cell separators during leukaphereses; to increase efficiency, hemopoietic progenitors are first mobilized into the circulation with growth factors and or chemotherapy. PBPC transplantation may have procedure-associated toxicity related to the mobilization, harvest or reinfusion of the graft.

INTRODUÇÃO

Em modelos experimentais, a administração de doses elevadas de quimioterapia e/ou radioterapia aumenta o índice de morte celular em neoplasias quimio e radiosensíveis¹. Foi possível demonstrar através de estudos *in-vitro* de linhas celulares neoplásicas em cultura que o incremento linear na concentração de agentes citotóxicos como os alquilantes ou as nitrosureias resulta no aumento exponencial da morte celular². Esta observação levou à utilização cada vez mais frequente de modalidades de quimioterapia ditas *intensivas* ou de *alta dose*, na tentativa de aumentar a eficácia do tratamento oncológico.

Nos últimos 30 anos, o desenvolvimento das técnicas de transplantação hematopoiética, quer alogénica quer autóloga, tem permitido o desenvolvimento de estratégias de tratamento anti-tumoral de carácter *mieloablativo* (com toxicidade medular irreversível), assegurando a reconstituição da função medular através da infusão de células hematopoiéticas progenitoras^{3,4}. As terapêuticas de alta dose empregam fármacos citotóxicos cuja toxicidade limitante habitual é hematológica (ultrapassada pela infusão do produto de suporte hematopoiético) e têm sido empregues no tratamento de neoplasias para as quais há alguma evidência clínica de efeito *dose-resposta*: tumores hematológicos como leucemias, doença de Hodgkin, linfomas não-Hodgkin e mieloma múltiplo e alguns tumores sólidos como carcinoma da mama ou do ovário²⁻⁵. De facto, o recurso ao suporte de progenitores hematopoiéticos permite escalar a dose dos fármacos citotóxicos até ser atingida a toxicidade não hematológica. Para alguns daqueles agentes, essa dose é várias vezes superior à utilizada nos esquemas convencionais de quimioterapia.

Classicamente, os progenitores hematopoiéticos capazes de assegurar a reconstituição hematológica são obtidos a partir da medula óssea, autóloga ou alogénica. A transplantação alogénica está limitada pela disponibilidade de dadores histocompatíveis e tem morbilidade e mortalidade consideráveis, sobretudo em idades mais avançadas, particularmente associada à ocorrência de doença do enxerto contra o hospedeiro⁶. A procura de modalidades alternativas de suporte hematopoiético, e a necessidade de alargar o tratamento a doentes mais velhos, levou ao emprego cada vez mais frequente de progenitores autólogos. Actualmente, quer na Europa quer na América do Norte, a maioria das transplantações hematopoiéticas são efectuadas com suporte autólogo⁵.

Embora em menor concentração do que na medula óssea, também no sangue periférico circulam progeni-

tores hematopoiéticos com capacidade para regenerar o sistema linfo-hematopoiético, após a administração de irradiação letal ou de quimioterapia *mieloablativa*.

A existência de células estaminais (*stem cells*) e de progenitores hematopoiéticos no sangue periférico (*Peripheral Blood Progenitor Cells*, PBPC) é conhecida há mais de 40 anos, quer em animais quer em seres humanos⁷⁻⁹. A título de exemplo, foi possível demonstrar num modelo animal que a transplantação de PBPC provenientes de ratinhos do sexo masculino e posteriormente infundidas em ratinhos do sexo feminino, previamente submetidos a doses letais de irradiação, resulta na reconstituição das células sanguíneas, medulares, esplénicas e tímicas originárias do dador¹⁰. Estes modelos experimentais começaram por demonstrar a capacidade de reconstituição hematológica daquelas células e permitiram ainda a investigação das suas características biológicas e funcionais, facilitando o início da sua aplicação à clínica^{9,10}. A primeira demonstração clínica de reconstituição hematopoiética com PBPC foi efectuada em 1979, quando Goldman et al¹¹ reinduziram a fase crónica num doente com leucemia mielóide crónica em fase acelerada da doença, através da transplantação autóloga de PBPC que haviam sido colhidos durante a primeira fase crónica. Desde essa data, a transplantação autóloga com PBPC tem conhecido uma expansão constante, não só no que diz respeito ao âmbito das suas aplicações clínicas como ainda ao aperfeiçoamento das metodologias de mobilização, colheita e processamento laboratorial. De facto, enquanto em 1991 somente 414 das 2786 transplantações hematopoiéticas autólogas realizadas na Europa foram com PBPC, em 1994 esta proporção foi de 4196 em 5920, respectivamente⁵.

VANTAGENS DA TRANSPLANTAÇÃO COM PBPC

Entre as vantagens da transplantação autóloga com PBPC, comparativamente ao suporte de medula óssea, contam-se as seguintes:

- *Possibilidade de colheita do produto celular de suporte hematopoiético em doentes com medula óssea fibrosada, hipocelular ou contaminada com tumor*: A transplantação com PBPC começou por ser empregue como alternativa à transplantação de medula óssea, em doentes cuja medula óssea se revelava insuficiente devido a hipocelularidade, fibrose (por exemplo, resultante de radioterapia abdominal prévia) ou invasão tumoral¹². Nestes doentes, o uso de progenitores do sangue periférico viabiliza o emprego de terapêuticas *mieloablativas*, já que assegura a reconstituição hematopoiética completa e duradoura mesmo perante a impossibilidade

de obter progenitores medulares.

- *Simplicidade de colheita.* A colheita de PBPC é feita em regime ambulatorio, por citaférese efectuada num separador celular, o qual pode ser usado também para a colheita de plaquetas em dadores saudáveis. Assim, evita ao doente a anestesia geral exigida habitualmente para a colheita de medula óssea. Este aspecto pode ser vantajoso para os doentes que não possam, ou não queiram, submeter-se ao risco anestésico (13). No entanto o tempo necessário para a colheita de PBPC excede a duração do procedimento de colheita de medula óssea.

- *Reconstituição hematopoiética mais rápida após reinfusão de PBPC do que de medula óssea.* Esta vantagem tem sido a razão mais importante para o constante incremento no uso de PBPC como suporte de quimioterapia de alta dose. A reinfusão de PBPC colhidas após mobilização com quimioterapia citotóxica e/ou factores de crescimento hematopoiético (ver *Mobilização e Colheita de PBPC*) resulta habitualmente na aceleração da recuperação hematopoiética pós-transplantação em cerca de sete dias, quando comparada com a reinfusão de medula óssea. De facto, a regeneração das séries leucocitária e plaquetária (avaliadas pelo número de dias após a reinfusão necessários para atingir 1.000 leucócitos/ μ l, 500 neutrófilos/ μ l e 20.000 ou 50.000 plaquetas/ μ l em circulação) é consideravelmente mais rápida do que na transplantação medular autóloga ou alogénica, sendo a diferença ainda maior quando os enxertos medulares são submetidos a depuração *ex-vivo*^{12,14-16}. Desde que o produto de PBPC contenha o número mínimo de progenitores necessário para que o doente possa ser submetido a quimioterapia de alta dose, a mediana da recuperação de 1.000 leucócitos/ μ l, de 500 neutrófilos/ μ l ou de 20.000 plaquetas/ μ l no sangue periférico ocorre entre 10 a 15 dias após a data da reinfusão. A administração de factores de crescimento hematopoiético (mais frequentemente G-CSF ou GM-CSF) após reinfusão de medula óssea permite reduzir o tempo de leucopenia e neutropenia graves para valores próximos dos obtidos com reinfusão de PBPC, mas não altera a recuperação plaquetária¹⁷⁻¹⁹. O encurtamento dos períodos de neutropenia e de trombocitopenia graves diminui a morbidade de etiologia infecciosa e hemorrágica, reduz o consumo de produtos sanguíneos e os riscos a ele associados, encurta o tempo de internamento e reduz os custos globais da transplantação^{15,16,18-23}.

- *Menor contaminação tumoral.* A transplantação hematopoiética autóloga acarreta a possibilidade, pelo menos teórica, de reinfusão de células tumorais contidas no enxerto e não detectadas por métodos morfológicos

convencionais. A transmissão accidental de leucemia aguda após infusão de medula óssea proveniente de um familiar que se pensava saudável, confirma a possibilidade da transmissão da neoplasia num enxerto hematopoiético²⁴. A relevância clínica de um tal grau de contaminação tumoral para a recidiva da doença neoplásica após a transplantação autóloga, é controversa²⁵. Contudo, foi recentemente demonstrado por técnicas de marcação genética o contributo das células tumorais ocultas contaminantes do enxertos autólogos para a recaída após transplantação, em crianças com leucemia aguda e neuroblastoma²⁶. Embora a incidência de contaminação tumoral oculta dos enxertos de PBPC possa ser inferior à dos enxertos de medula óssea nalgumas patologias²⁷⁻³⁴, constituindo uma vantagem potencial para os primeiros, deve notar-se que os enxertos derivados do sangue periférico contêm um número de células superior ao dos produtos medulares. Este facto aumenta a probabilidade de infusão de células tumorais, se presentes no produto de transplante mesmo em proporções diminutas.

A eficácia na detecção de células neoplásicas em enxertos de PBPC depende não só da doença de base e da sua forma de apresentação²⁹⁻³⁴, como também da sensibilidade do método de diagnóstico utilizado (imunofenotipagem, imunocitoquímica, *polimerase chain reaction* ou culturas celulares)^{29,31,35-37}. É também controversa a influência exercida pelas técnicas de mobilização de PBPC (quimioterapia citotóxica e/ou factores de crescimento hematopoiético) sobre a potencial contaminação tumoral do enxerto de PBPC estando descrita tanto a mobilização de células tumorais em associação com a mobilização de PBPC em doentes com carcinoma da mama³⁸, como a libertação de progenitores hematopoiéticos medulares não neoplásicos para o sangue periférico após a administração de quimioterapia em doentes com leucemia mielóide crónica^{39, 40}.

AValiação QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO ENXERTO DE PBPC

A principal preocupação dos investigadores que utilizaram inicialmente os progenitores hematopoiéticos circulantes para suporte da *quimioterapia intensiva* foi a de assegurar que os enxertos colhidos a partir do sangue periférico tinham, de facto, capacidade para regenerar as linhagens mielóide e linfóide, quando infundidos em doentes submetidos a terapêuticas *mieloablativas* - ou seja, que as suas propriedades eram sobreponíveis às dos progenitores medulares.

Hoje, é sabido que os enxertos hematopoiéticos, quer de origem medular quer periférica, contêm células esta-

minais pluripotentes e progenitores mais maduros. As primeiras caracterizam-se pela capacidade de auto-renovação, de proliferação e de diferenciação em qualquer das séries hematopoiéticas, enquanto que os progenitores hematopoiéticos mais maduros estão já comprometidos numa determinada linha de diferenciação hematológica, perdendo portanto potencialidades de auto-renovação. Enquanto a biologia dos progenitores relativamente maduros se encontra já bem estudada com as técnicas laboratoriais existentes⁴¹, a caracterização e o comportamento das células estaminais pluripotentes é de difícil avaliação *in vitro*⁴²⁻⁴⁵. Para assegurar uma recuperação hematopoiética rápida, o enxerto deve ser rico em progenitores relativamente diferenciados das diferentes linhagens, que depressa originem os vários componentes do sangue, reduzindo ao mínimo os períodos de neutropenia e trombocitopenia após a transplantação. No entanto, para que a hematopoiese seja duradoura é também necessário infundir um número *suficiente* de células estaminais pluripotentes, que funcionem como reserva capaz de assegurar a produção de células maduras durante toda a vida do doente.

O número total de células mononucleadas do enxerto hematopoiético, em função do peso do doente, constituiu o primeiro parâmetro de avaliação da qualidade/quantidade dos enxertos, tanto de medula óssea como de PBPC. Contudo, embora se trate de um parâmetro de fácil utilização na prática clínica, não se demonstrou ter boa correlação com a regeneração hematopoiética pós-transplantação⁴⁶. De maior interesse são os ensaios clonogénicos, que visam a identificação de progenitores já com algum grau de diferenciação nas diversas séries hematopoiéticas, designados por CFU-GM¹, BFU-E², CFU-E³ ou CFU-GEMM⁴.

Até há alguns anos, o parâmetro habitualmente utilizado na avaliação da qualidade/quantidade do enxerto de PBPC era a quantificação de CFU-GM, dada a sua boa correlação com a regeneração das linhagens leucocitária, plaquetária e eritrocitária⁴⁶⁻⁴⁹. Existe no entanto uma grande diversidade de metodologias para a realização daqueles ensaios e, conseqüentemente, variabilidade de resultados entre diferentes laboratórios. Apesar disso, doentes transplantados com um mínimo de 1 a 5x10⁵ CFU-GM/Kg têm geralmente uma recuperação hematológica rápida e duradoura⁴⁶. Além da variabilidade entre instituições, a principal desvantagem da quantifi-

cação de CFU-GM é o tempo de cultura exigido pelos ensaios clonogénicos, de pelo menos 14 dias⁴¹.

Os progressos recentemente verificados na caracterização fenotípica das células estaminais e dos progenitores hematopoiéticos têm constituído um instrumento rápido e reprodutível na avaliação das capacidades de regeneração hematopoiética dos enxertos de PBPC. Assim, demonstrou-se que os progenitores medulares possuem uma glicoproteína de membrana, o antígeno CD34, presente tanto nos precursores mais diferenciados como nos elementos medulares mais imaturos, e provavelmente também nas verdadeiras células estaminais responsáveis pela manutenção da hematopoiese humana⁵⁰⁻⁵⁴. O grau de diferenciação das células CD34 pode ainda definir-se com base na co-expressão de outros marcadores de membrana. A ausência de marcadores específicos das linhagens mielóide ou linfóide, de antígenos como HLA-DR, CD38 e CD71, associadas à fraca incorporação de Rodamina, à expressão do antígeno Thy 1 e da glicoproteína 170 responsável pelo fenótipo MDR⁺ (*multiple drug resistance*) caracteriza uma população de células hematopoiéticas muito imaturas incluindo possivelmente as células estaminais pluripotenciais^{44,55}.

As técnicas de citometria de fluxo actualmente disponíveis permitiram estabelecer que as células CD34⁺ constituem 1% a 4% das células medulares, das quais apenas 1 a 10% são verdadeiramente imaturas, não expressando marcadores específicos de linhagem^{46,49,56,57}. Embora em condições normais as células CD34⁺ circulem no sangue periférico em concentrações que não ultrapassam os 10% da concentração encontrada na medula óssea, as estratégias de mobilização de PBPC aumentam significativamente este número, tornando assim mais eficazes as colheitas de PBPC^{17, 50, 58, 59}.

No contexto de transplantação com PBPC, é importante definir não só o momento ideal para o início das citaféreses como também a altura em que se encontram já colhidos números suficientes de progenitores hematopoiéticos. A enumeração de células CD34⁺ não tem as limitações dos ensaios clonogénicos, pelo que é actualmente aceite como o parâmetro mais útil para a avaliação dos enxertos de PBPC^{19,45,50}. A definição do número mínimo de células CD34⁺ no produto de PBPC necessárias para assegurar a recuperação hematopoiética pós-transplantação varia contudo entre instituições, o que se deve possivelmente à ausência de uniformização nas metodologias usadas na sua quantificação^{48,49,60,61}. Contudo, valores de 2 a 2,5x10⁶ células CD34⁺/Kg de peso corporal do receptor parecem ser os mínimos aceitáveis para assegurar uma recuperação hematopoiéti-

¹Colony-forming unit granulocyte-macrophage

²Burst-forming unit erythroid

³Colony-forming unit erythroid

⁴Colony-forming unit granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte

ca rápida e duradoura^{46,62-64}. Embora a recuperação hematopoiética pós-transplantação possa ser mais rápida após a reinfusão de produtos contendo pelo menos 5×10^6 células CD34+/Kg (em comparação com valores variando entre 2 e 5×10^6), enxertos com mais do que 5×10^6 células CD34+/Kg já não aceleram mais a recuperação hematopoiética⁶⁴.

A maioria dos estudos clínico-laboratoriais nos quais se avaliou em paralelo o número de CFU-GM e o de células CD34+ contidas no enxerto demonstrou a existência de uma excelente correlação entre ambos, embora alguns autores não tenham confirmado esses resultados^{19,45,46,65,66}. Em doentes submetidos a mobilização de PBPC, o número de elementos CD34+ começa a aumentar em circulação 1 a 2 dias mais cedo do que o de CFU-GM, mas o seu valor máximo parece ser atingido simultaneamente. Tal facto permite utilizar a quantificação de células CD34+ também para definir o momento ideal para iniciar as citaféreses para colheita de PBPC^{50,66,67}.

MOBILIZAÇÃO E COLHEITA DE PBPC

Conforme já referido, em condições basais a concentração de progenitores hematopoiéticos no compartimento circulante é baixa, sendo necessário a realização de seis ou mais citaféreses convencionais para colheita de um produto adequado¹². Por outro lado, a cinética da recuperação hematopoiética após reinfusão de PBPC colhidas em estado basal (isto é, quando a hematopoiese não foi previamente estimulada), é semelhante à da reinfusão de medula óssea^{12,68}. No entanto após a administração de factores de crescimento hematopoiético, bem como na fase de recuperação da mielosupressão induzida por quimioterapia citotóxica convencional, a concentração de progenitores hematopoiéticos no compartimento circulante aumenta em média 18 a 35 vezes, fenómeno denominado de mobilização de PBPC^{20, 69, 70}. Esta circunstância permite diminuir o número de citaféreses necessárias para a colheita do enxerto hematopoiético. Em contraste com a recuperação hematopoiética associada à reinfusão de medula óssea ou de PBPC colhidas sem mobilização, a reinfusão de PBPC mobilizadas com factores de crescimento hematopoiético, quimioterapia citotóxica, ou sua combinação, acelera a recuperação mielóide e plaquetária, resultando num menor consumo de produtos sanguíneos, num menor número de dias com febre e, em consequência, no encurtamento do internamento hospitalar^{15,23,71-74}. Os percursoros hematopoiéticos mobilizados podem ser usados tanto em transplantação autóloga como alogénica^{75,76}.

Existem múltiplas estratégias de mobilização de PBPC, ainda que as mais utilizadas na prática clínica sejam a administração isolada de factores de crescimento hematopoiético (sobretudo G-CSF e GM-CSF) e o uso sequencial de quimioterapia citotóxica e factores de crescimento hematopoiético. As principais vantagens da primeira estratégia são evitar a ocorrência de neutropenia febril e a menor variabilidade, entre doentes, do dia de concentração circulatória máxima de progenitores e, portanto, do dia ideal para iniciar as sessões de citaférese. A segunda estratégia tem a vantagem de fazer coincidir a mobilização de PBPC com a administração de tratamento anti-neoplásico, contribuindo possivelmente para a depuração tumoral *in vivo* no compartimento circulatório, imediatamente antes da colheita de PBPC. De facto, alguns autores demonstraram que a contaminação oculta do sangue periférico ou de produtos de citaférese com células tumorais diminui com a administração de ciclos sucessivos de quimioterapia citotóxica^{38,77}.

As PBPC são colhidas num separador celular também usado para outros fins como, por exemplo, a colheita de plaquetas. O sangue do doente percorre o circuito extracorporal, sendo-lhe retirada uma fracção das células nucleadas em cada passagem pelo separador. Assim, numa sessão habitual de citaférese passa pelo separador um volume de sangue correspondente a duas ou três volúmeas, ao longo de pelo menos duas horas, sendo o produto normalmente colhido a um débito de 1 a 3 ml/min. Salvo raras excepções⁷⁸⁻⁸⁰, esta técnica implica a realização de três ou mais sessões de citaférese, de modo a colher um número adequado de progenitores para transplantação, em contraste com um procedimento único para colheita de medula óssea.

A eficácia da colheita de PBPC pode também ser aumentada através da realização de citaféreses de alto débito⁸¹⁻⁸³.

TOXICIDADE DA TRANSPLANTAÇÃO COM PBPC

Tal como na transplantação medular autóloga, as complicações mais graves da transplantação com PBPC são determinadas pelas altas doses de quimioterapia e/ou radioterapia dos regimes de condicionamento. Adicionalmente, os processos de mobilização, colheita e reinfusão do produto de PBPC condicionam também toxicidades potenciais. Por exemplo, a mobilização de PBPC com quimioterapia citotóxica associa-se a um risco não desprezável de neutropenia febril, incluindo sépsis, cuja frequência aumenta com a intensidade da quimioterapia utilizada⁸⁴⁻⁸⁶. Por outro lado, a mobilização de PBPC apenas com factores de crescimento hematopoiético

causa efeitos acessórios ligeiros, como febre, cefaleias, dores osteomusculares e mal estar geral^{23, 86-88}. Os procedimentos de citaférese podem ter também alguma toxicidade, incluindo sintomatologia associada a hipocalcemia, risco de hemorragia relacionado com a anticoagulação ou trombocitopenia e riscos associados à colocação e manipulação de catéteres centrais, quando estes são utilizados⁸¹⁻⁸³. Por último a infusão de PBPC tem uma toxicidade sobreponível à da infusão de medula óssea, determinada pela presença do agente crioprotector DMSO (dimetilsulfóxido), de detritos celulares e de hemoglobina livre^{88,89}. Contudo, o maior volume habitual dos produtos de PBPC, causado pela maior celularidade destes enxertos, pode implicar um maior risco de toxicidade associada à reinfusão.

A recuperação hematológica mais rápida característica da transplantação de PBPC, ao diminuir a morbidade infecciosa e hemorrágica, as necessidades transfusionais e a duração do internamento tem justificado a preferência pelo suporte hematopoiético com PBPC, em detrimento do uso de medula óssea^{5,15,16,18-23}. Há que referir que a tecnologia actualmente disponível não permite abolir o período de neutropenia e trombocitopenia graves (inferiores a 500 neutrófilos/ μ l e a 20.000 plaquetas/ μ l). Talvez num futuro próximo o uso de progenitores hematopoiéticos expandidos *ex vivo* possa contribuir para a diminuição deste factor de risco, em doentes submetidos a transplantação hematopoiética⁹⁰.

COMENTÁRIO FINAL

Ainda que não se encontrem definitivamente estabelecidas as indicações para o emprego de *quimioterapias intensivas* ou de *alta dose* na maioria das neoplasias hematológicas e sólidas, a sua utilização em contexto de ensaio clínico tem crescido exponencialmente na Europa e nos Estados Unidos. A possibilidade de utilizar progenitores do sangue periférico reduz de forma importante a toxicidade associada ao procedimento, cuja mortalidade não ultrapassa actualmente os 5% na maior parte dos centros de transplantação. Ao acelerar a regeneração da série mielóide, a transplantação de PBPC reduz os custos associados aos internamentos prolongados, ao consumo de antibióticos, de produtos sanguíneos e de outras medidas de suporte, e torna assim cada vez mais acessível e menos tóxica esta modalidade de tratamento oncológico.

Muitos aspectos da transplantação de PBPC carecem ainda de melhoramento; nomeadamente, torna-se necessário continuar a investigar estratégias que permitam reduzir a probabilidade de recidiva da doença neoplásica, após o transplante. Estratégias potenciais

incluem: a) o uso de múltiplos ciclos de quimioterapia intensiva com suporte hematopoiético, b) a intensificação dos regimes de condicionamento aproveitando o perfil farmacocinético dos agentes anti-tumorais, c) a depuração tumoral do enxerto quando a probabilidade de contaminação por células neoplásicas seja elevada, d) a imunomodulação, visando estimular o sistema imunológico com o objectivo de erradicar a doença neoplásica residual após transplantação. No futuro, é possível que a expansão *ex vivo* de progenitores hematopoiéticos e células estaminais pluripotentes, a partir de um número reduzido de células colhidas por punção venosa ou aspiração medular e utilizando factores de crescimento, permita obter enxertos de menor volume e menos contaminados por células tumorais. Esta tecnologia, ao produzir quantidades elevadas de progenitores diferenciados, poderá encurtar ou abolir os períodos de leucopenia e trombocitopenia após quimioterapia. A terapêutica genética, através da inserção de genes de interesse em progenitores hematopoiéticos (por exemplo, o gene de resistência a múltiplas drogas), constitui um campo promissor, não só para o estudo da biologia da hematopoiese como também de manipulação terapêutica anti-neoplásica em transplantação hematopoiética autóloga.

BIBLIOGRAFIA

- GALE RP, CHAMPLIN RE (eds): New strategies in bone marrow transplantation. New York, Wiley-Liss, 1990.
- FREI E, ANTMAN K, TEICHER B et al: Bone marrow autotransplantation for solid tumors - prospects. J Clin Oncol 1989; 7:515-526.
- GALE RP, HENON P, JUTTNER C: Blood stem cell transplants come of age. Bone Marrow Transplant 1992; 9:151 - 155.
- CHOPRA R: High dose therapy: the third UCH meeting. Br J Cancer 1994; 69: 788-791.
- GRATWOHL A, HERMANS J, BALDOMERO H: Hematopoietic precursor cell transplants in Europe: activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplant 1996; 17:137-148.
- FORMAN SJ, BLUME KG, THOMAS ED (EDS): Bone marrow transplantation. Blackwell Scientific Publications, Boston, Massachusetts, 1994.
- BRECHER G, CRONKITE EP: Post-radiation parabiosis and survival in rats. Proc Soc Exp Biol Med 1951; 77:292-304.
- EPSTEIN RB, GRAHAM TC, BUCKNER CD: Allogeneic marrow engraftment by cross circulation in lethally irradiated dogs. Blood 1966; 28:692-707.
- MC CREDIE KB, HERSH EM, FREIREICH EJ: Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. Science 1971; 171: 293-294.
- MOLLINEUX G, PODJA Z, HAMPSON IN et al: Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. Blood 1990; 76:2153-2158.
- GOLDMAN JM, CATOVSKY D, HOWS J et al: Cryopreserved peripheral blood cells functioning as autografts in patients with chronic granulocyte leukemia in transformation. Br Med J 1979; 1:1310-1313.
- KESSINGER A, ARMITAGE JO, SMITH DM et al: High dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma. Blood 1989; 74:1260-1265.

13. LEE J-H, KLEIN HG: Collection and use of circulating hematopoietic progenitor cells. *Hematol Oncol Clin North America*, 1995; 9:1-22.
14. REIFFERS J, CASTAIGNE S, TILLY H et al: Hematopoietic reconstitution after autologous blood stem cell transplantation: a report of 46 cases. *Plasma Ther Transf Technol* 1987; 8:360-366.
15. TO LB, ROBERTS MM, HAYLOCK DN et al: Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9:277-284.
16. HENON PR, LIANG H, BECK-WIRTH G et al: Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9:285-291.
17. SIENA S, BREGNI M, BONSI L et al: Increase in peripheral blood megakaryocyte progenitors following cancer therapy with high dose cyclophosphamide and hematopoietic growth factors. *Exp Hematol* 1993; 21:1583-1590.
18. LANGENMAYER I, WEAVER C, BUCKNER CD et al: Engraftment of patients with lymphoid malignancies transplanted with autologous marrow, peripheral blood stem cells or both. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15:241-246.
19. ZIMMERMAN TM, MICK R, MEYERS S et al: Source of stem cells impacts on hematopoietic recovery after high dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplantation* 1995; 15:923-927.
20. GIANNI AM, SWANA M, BREGNI M et al: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor to harvest circulating haematopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet* 1989; 2:580-85.
21. BENSINGER W, SINGER J, APPLEBAUM F et al: Autologous transplantation with peripheral blood stem cells collected after administration of recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Blood* 1993; 81:3158-3163.
22. CHAO NJ, SCHRIBER JR, GRIMES K et al: Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 1993; 81: 2031-2035.
23. SHERIDAN WP, BEGLEY CG, JUTTNER CA et al: Effects of peripheral blood progenitors mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high dose therapy. *Lancet* 1993; 339:640-44
24. NIEDERWIESER DW, APPLEBAUM FR, GASTL G et al: Inadvertent transmission of a donor's acute myeloid leukemia in bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1990; 322:1794-96.
25. SHARP JG, JOSHI SS, ARMITAGE JO et al: Significance of detection of occult non Hodgkin's lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique. *Blood* 1992; 79:1074-1080.
26. BRENNER MK, RILL DR, MOEN RC et al: Gene marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341:85-86.
27. TO LB, RUSSELL J, MOORE S, JUTTNER CA: Residual leukemia cannot be detected in very early remission peripheral blood stem cell collections in acute non-lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 1987; 11, 327-329.
28. LANGLAND K, CRAIG JIO, PARKER AC, ANTHONY RS: Molecular determination of minimal residual disease in peripheral stem cell harvests. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5:64-65.
29. PASSOS-COELHO JL, ROSS AA, MOSS TJ et al. Absence of breast cancer cell mobilization into peripheral blood progenitor cell collections by priming with cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Bood* 1995; 85:1138-43.
30. PASSOS-COELHO JL, BRAINE HG, DAVIS JM et al: Similar breast cancer cell contamination of single-day peripheral-blood progenitor cell collections obtained after priming with hematopoietic growth factor alone or after cyclophosphamide followed by growth factor. *J Clin Oncol* 1996; 14:2569-2575.
31. CRAIG JIO, LANGLANDS K, PARKER AC, ANTHONY RS: Molecular detection of tumor contamination on peripheral blood stem cell harvests. *Exp Hematol* 1994; 22:898-902.
32. SHARP JG, KESSINGER A, VAUGHAN WP et al: Detection and clinical significance of minimal tumor cell contamination of peripheral stem cell harvests. *Int J Cell Cloning* 1992; 10 (suppl 1): 92-94.
33. LEMOLI RM, FORTUNA A, MOTTA RM et al: Concomitant mobilization of plasma cells and hematopoietic progenitors into peripheral blood of multiple myeloma patients: positive selection and transplantation of enriched CD34+ cells to remove circulating tumor cells. *Blood* 1996; 87:1625-34.
34. GAZITT Y, TIAN E, BARLOGIE B et al: Differential mobilization of myeloma cells and normal hematopoietic stem cells in multiple myeloma after treatment with cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1996; 87:805-811.
35. NAGAFUGI K, HARADA M, TAKAMATSU Y et al: Evaluation of leukaemic contamination in peripheral blood stem cell harvests by reverse transcription polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1993; 85:578-583.
36. HARDINGHAN JE, KOTASEK D, SAGE RE et al: Molecular detection of residual lymphoma cells in peripheral blood stem cell harvests and following autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11:15-20.
37. SHARP JG, MANN SL, MURPHY B, WEEKES C: Culture methods for the detection of minimal tumor contamination of hematopoietic harvests. *J Hematother* 1995; 4:141-148.
38. BRUGGER W, BROSS KJ, GLATT M et al: Mobilization of tumor cells and hematopoietic stem cells in to peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 1994; 83:636-40.
39. CARELLA AM, PODESTA M FRASSONI F et al: Selective overshoot of Ph-negative blood hematopoietic cells after intensive idarubicin-containing regimens and their repopulating capacity after reinfusion. *Stem Cells* 1993; 11 (suppl3):67-72.
40. CARELLA AM, PODESTA M FRASSONI F et al: Collection of normal repopulating cells during early hematopoietic recovery after intensive conventional therapy in chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12:267-271.
41. MESSNER HA: Human stem cells in culture. *Clinics in Hematology* 1984; 13:393-404.
42. LEARY AG, IKEBUCHI K, IRAI Y et al: Synergism between interleukin 6 and interleukin 3 in supporting the proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin 1. *Blood* 1984; 71:1759-1763.
43. BRANDT JE, BAIRD N, LU L et al: Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies in vitro. *J Clin Invest* 1988; 82:1017-1027.
44. SROUR EF, BRANDT JE, BRIDDELL RA et al: Human CD34+ bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long term in vitro hematopoiesis. *Blood Cells* 1991; 17: 287-295.
45. SROUR EF, BRANDT JE, BRIDDELL RA et al: Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitors in vitro. *Blood* 1993; 81:661-669.
46. BENDER JG, TO LB, WILLIAMS S, SCHWARTZBERG LS: Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; 1:329-341.
47. BENDER JG, LUM L, UNVERZAGT KL et al: Correlations of colony-forming cells, long-term culture-initiating cells and CD34+ cells in apheresis products from patients mobilized for peripheral blood progenitors with different regimens. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13:479-485.
48. WUNDER E, SOVALAT H, FRITSCH G et al: Report on the European workshop on peripheral blood stem cell determination and standardization-Mulhouse, France, February 6-8, 1992. *J Hematother* 1992; 1:131-142.
49. SOVALAT H, WUNDER E, TIENHARA A et al: Commentary: prospects for standardization of stem cell determination within Europe. *J Hematother* 1993; 3:293-296.
50. SIENA S, BREGNI M, BRANDO B et al: Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation for cancer patients. *Blood* 1991; 77:400-409.
51. CIVIN CI, STRAUS LC, BROVALL C et al: Antigenic analysis of

- the hematopoiesis III: A hematopoietic progenitor cell antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984; 133:157-165.
52. CIVIN CI, BANQUERIGO ML, STRAUSS LC, LOKEN MR: Antigenic analysis of the hematopoiesis IV: Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in human bone marrow. *Exp Hematol* 1987; 15:10-17.
53. CIVIN CI, GORE SD: Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 1993; 2:137-144.
54. SUTHERLAND DR, KEATING A: The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. *J Hematother* 1992; 1:115-129.
55. BAUM CM, WEISSMAN IL, TSUKAMOTO AS et al: Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2804-2808.
56. LU L, WALKER D, BROXMEYER HE et al: Characterization of adult human bone marrow hematopoietic progenitors highly enriched by two colour cell sorting with the My-10 and major histocompatibility class II monoclonal antibodies. *J Immunol* 1987; 139:1823-1829.
57. BUHRING HJ, ASENBAUER B, KATRILAKA K et al: Sequential expression of CD34 and CD33 antigens on myeloid colony forming cells. *Eur J Haematol* 1989; 42:143-149.
58. RAVAGNANI F, SIENA S, BREGNI M et al: Large scale collection of circulating haematopoietic progenitors in cancer patients treated with high-dose cyclophosphamide and recombinant human GM-CSF. *Eur J Cancer* 1990; 26:562-564.
59. SCHWARTZBERG LS, BIRCH R, BLANCO R et al: Rapid and sustained hematopoietic reconstitution by peripheral blood stem cell infusion alone following high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11:369-374.
60. TRISCHMANN TM, SCHEPERS KG, CIVIN C: Measurement of CD34⁺ cells in bone marrow by flow cytometry. *J Hematother* 1993; 2:305-13.
61. TITLEY I, HEALY LE, SCOTT M et al: Extent and variability inherent in measurements of CD34-positive cells in different hematopoietic tissues. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16:611-616.
62. KORBLING M, HUH YO, DURETT N et al: Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34⁺ Thydim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host-disease. *Blood* 1995; 86:2842-2848.
63. TRICOT G, JAGANNATH S, VESOLE D et al: Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment. *Blood* 1995; 85:588-596.
64. WEAVER CH, HAZELTON B, BIRCH R et al: An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor collections in 692 patients after the administration of myeloablative therapy. *Blood* 1995; 86: 3961-3969.
65. SERKE S, SAUBERLICH S, HUH D: Multiparameter flow-cytometrical quantification of circulating CD34⁺ cells: correlation to the quantitation of circulating haematopoietic progenitor cells by in vitro colony assays. *Br J Haematol* 1991; 77:453-459.
66. PASSOS-COELHO JL, MACHADO A, LUCIO P et al: Large volume leucaphereses are more efficient than standart volume leucaphereses for collection of peripheral blood progenitor cells. *J Hematother* 1997; 6:465-474.
67. BENDER JG, WILLIAMS SF, MYERS S et al: Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10:281-285.
68. LOBO F, KESSINGER A, LANDMARK JD et al: Addition of peripheral blood stem cells collected without mobilization techniques to transplanted autologous bone marrow did not hasten marrow recovery following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 389-392.
69. TO LB, SHEPPERD KM, HAYLOCK DN et al: Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Exp Hematol* 1990; 18:442-447.
70. SOCINSKI MA, ELIAS A, SCHNIPPER L et al: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating hematopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988; 1:1194-98.
71. GIANNI AM, BREGNI M, SIENA S et al: Rapid and complete hemopoietic reconstitution following combined transplantation of autologous blood and bone marrow cells. A changing role for high dose chemoradiotherapy ? *Hematol Onc* 1989; 7:139-48.
72. ELIAS AD, AYASH L, ANDERSON KC et al: Mobilization of peripheral blood progenitor cells by chemotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for hematologic support after high dose intensification for breast cancer. *Blood* 1992; 79:3036-44.
73. MYERS SE, WILLIAMS SF, GELLER RB: Cyclophosphamide mobilization of peripheral blood stem cells for use in autologous transplantation after high dose chemotherapy: clinical results in patients with contaminated or hypocellular bone marrow. *J Hematother* 1992; 1:27-33.
74. HO AD, GLUCK S, GREMOND G et al: Optimal timing for collections of blood progenitor cells following induction chemotherapy and granulocyte-macrophage colony stimulating factor for autologous transplantation in advanced breast cancer. *Leukemia* 1993; 7:1738-46.
75. BENSINGER WI, CLIFT R, MARTIN P et al: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematological malignancies: a retrospective comparison with bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88:2794-800.
76. SCMIZT N, BACIGALUPO A, LABOPIN M et al: Transplantation of peripheral blood progenitor cells from HLA-identical sibling donors. *Br J Haematol* 1996; 95:715-723.
77. PASSOS-COELHO JL, ROSS AA, DAVIS JA et al: Bone marrow micrometastases in chemotherapy-responsive advanced breast cancer - effect of ex-vivo purging with 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Res* 1994; 54:2366-71.
78. PETTENGE R, MORGENSTERN GR, WOLL PJ et al: Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single apheresis. *Blood* 1993; 82:3770-77.
79. JONES HM, JONES SA, WATTS MJ et al: Development of a simplified single-apheresis approach for peripheral blood progenitor cell transplantation in previously treated patients with lymphoma *J Clin Oncol* 1994; 12:1693-1702.
80. KOUMAKIS G, VASSILOMANOLAKIS M, HATZICHRISTOU H et al: Predictive factors affecting mobilization and peripheral blood stem cell collection using single apheresis for rescuing patients after high dose chemotherapy in various malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18:1065-1072.
81. HILLYER CD, TIEGERMAN KO, BERKMAN EM: Increase in circulating colony forming units-granulocyte-macrophage during large volume leukapheresis: evaluation of a new cell separator. *Transfusion* 1991; 31:327-32
82. MALACHOWSKI ME, COMENZO RL, HILLYER CD et al: Large volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collections in patients with hematological malignancies. *Transfusion* 1992; 32:732-35.
83. PASSOS-COELHO JL, BRAINE HG, WRIGHT SK et al: Large-volume leukapheresis using regional citrate anticoagulation to collect peripheral blood progenitor cells. *J Hematother* 1995; 4:11-19.
84. KOTASEK D, SHEPPERD KM, SAGE RE et al: Factors affecting blood stem cell collections following high-dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 11-17.
85. HAAS R, HOHAUS S, EGERE G et al: Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) subsequent to chemotherapy improves collection of blood stem cells for autografting in patients not eligible for bone marrow harvesting. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9:459-465.
86. BOIRON J-M, MARIT G, FABERES C et al: Collection of peripheral blood stem cells in multiple myeloma following single high-dose cyclophosphamide with and without recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF). *Bone Marrow Transplant* 1992; 9:459-465.

cyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF). Bone Marrow Transplant 1993; 12:49-55.

87. FUKUDA M, KIJIMA S, MATSUMOTO K, MATSUMAYA T: Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and recombinant human granulocyte colony stimulating factor in childhood neuroblastoma and non-Hodgkin's lymphoma. Br J Haematol 1992; 80:327-331.

88. KESSINGER A, SCHMIT-POKORNY K, SMITH D, ARMITAGE

J: Cryopreservation and infusion of autologous peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant 1990; 5 (suppl1) 25-27.

89. DAVIS JM, ROWLEY SD, BRAINE HG et al: Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. Blood 1990; 75:781-786.

90. HAYLOCK DN, TO LB, DROWSE CA et al: Ex-vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. Blood 1992; 80:1405-12.