LABORATÓRIOS EM TRANSPLANTES

LABORATÓRIOS EM TRANSPLANTES**036****QUALITY CONTROL OF CRYOPRESERVED HEMATOPOIETIC STEM CELLS USED FOR HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION (HSCT)**V MC¹, Reis-Alves SC¹, Vigorito AC¹, Rocha FF¹, Cunha FP¹, Souza CA¹, Lorand-Metze I¹¹Hemocentro de Campinas/Unicamp

Introduction: high-dose therapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been widely used in hematological neoplasms. But, an optimal number of peripheral blood hematopoietic stem cells (PBHSC) is necessary to ensure a good engraftment. Concentration and viability of CD34+ cells has always been quantified in the apheresis product soon after collection, but the necessity to repeat these measures post-thaw is controversial. We examined prospectively the loss of CD34+ cells during collection (PRE), preparation for freezing (INT) and post-thaw (POS) in apheresis products collected for autologous HSCT. **Methods:** the concentration and viability of total nucleated cells as well as CD34+ cells of 45 PBHSC collection procedures for autologous HSCT were analyzed PRE, INT and POS of the units. We also examined the number of procedures / patient according to diagnosis, and the relation of all the variables obtained with neutrophil and platelet engraftment. Quantification of CD34+ cells was performed by the ISHAGE protocol (viability test - 7-AAD exclusion). **Results:** The median number of CD34+ cells collected per unit (PRE) was $1.61 \times 10^6/\text{kg}$ (0.55 – 8.1) corresponding to a median of 526 CD34+ events measured, with a viability from 97% to 100%. This number had decreased to a median of $1.38 \times 10^6/\text{kg}$ (0.47 – 8.0) (INT). However, after thawing, the median of CD34+ cells was $1.17 \times 10^6/\text{kg}$. Viability PRE was 97%-100% and POS it was 86%-98%. The median cell recovery after the whole procedure was 81% (38%-99%). The viability was not dependent on the length of the storage period, but on the ratio between viable CD34+ and total nucleated cells from the PRE and POS leukapheresis product. Patients with a higher viability of CD34+ cells POS had a faster neutrophil engraftment. Loss of viable cells was higher in Hodgkin's Lymphoma. **Conclusion:** quantification of viable CD34+ cells after thawing is necessary in poor mobilizers, and in patients that had several lines of chemotherapy and radiotherapy previous to HSCT in order to ensure a good engraftment.

037**IMPLEMENTAÇÃO DE UM BANCO DE AMOSTRAS NO ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES SUBMETIDOS AO TCTH NO CEMO: IMPACTO NAS PESQUISAS BÁSICO-TRANSLACIONAL E CLÍNICA.**Ferreira GL¹, Rezende MA¹, Pinto DO¹, Gomes BE¹, Bouzas LF¹, Abdelhay E¹¹Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) - Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Introdução: O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) alogênico é uma modalidade terapêutica utilizada em várias doenças do sistema linfopoiético. Apesar de mais de 50 anos de experiências nesta terapia celular e do enorme avanço obtido no uso de diferentes fontes de células, modalidades de regimes de condicionamento e nas profilaxias das complicações no pós-transplante, muitos aspectos biológicos ainda são desconhecidas. No sentido de propiciar as condições ideais de pesquisa, sejam básicas ou clínicas, a Divisão de Laboratórios do CEMO (DLC) iniciou em 2005 um banco de amostras de pacientes sub-

metidos ao TCTH denominado BTCTH. O BTCTH além de fornecer as amostras biológicas, ainda dispõe de todas as informações clínicas e laboratoriais necessárias à compreensão do histórico do paciente armazenadas em um banco de dados. **Metodologia:** São coletadas amostras de sangue periférico nos seguintes dias: D-8, D0, D+14, D+28, D+45, D+100, D+180, D+360. Essas amostras são encaminhadas para a DLC, as quais são codificadas e processadas de acordo com os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs), sendo destinadas para Imunofenotipagem do perfil das populações celulares, extração de RNA/DNA, congelamento de plasma, soro e células, sendo todas as amostras criopreservadas em freezer -70 oC para posterior utilização em protocolos de pesquisa. O banco de dados é constituído de dados revistos dos prontuários e armazenados em planilhas. **Resultados:** o BTCTH dispõe atualmente de um total de 1900 amostras biológicas, sendo feitas em média 230 amostras por ano (inclui-se alíquotas de plasma, soro, RNA/DNA, proteínas, arquivos de imunofenotipagem e células criopreservadas de acordo com os dias específicos citados, correspondentes a 246 pacientes submetidos ao TCTH alogênico desde 2005, cujo aceitaram doar suas amostras para a pesquisa. O número de pacientes cadastrados teve um aumento progressivo nos dois primeiros anos atingindo uma média de 42 pacientes/ano após 2008. Em relação a DECHa, dentre os 246 pacientes encontrados nessa coorte, cerca de 53% foram acometidos pela doença, sendo 49% desses pacientes submetidos os TCTH alo aparentado e os outros 4% se subdividem em TCTH não aparentado e singeneico. Ainda, 95% dos pacientes com DECH que foram submetidos ao TCTH alo aparentado e 100% dos pacientes que foram submetidos aos TCTH singeneico e alo aparentado (sangue periférico e sangue de cordão umbilical e placentário) receberam regime de condicionamento mieloablativo, bem como, tiveram maior prevalência de DECH estadiamento II, sendo a pele o principal órgão de acometimento. Além disso, as amostras do BTCTH já foram utilizadas em pesquisas que resultaram na obtenção de 2 doutorados e 1 mestrado e que versaram principalmente na presença ou ausência de determinadas populações celulares, relacionando-as com a DECH. No momento, duas pesquisas principais fazem uso deste banco, a que procura por biomarcadores plasmáticos de DECH (através de técnicas proteômicas) e a que tenta relacionar recaída ao uso de ATG de coelho no condicionamento da AAS. **Conclusão:** A existência de um banco de amostras biológicas dos pacientes em acompanhamento no pós TCTH permite estudos retrospectivos e prospectivos dos mecanismos celulares e moleculares que embasam as complicações no pós TCTH. **Apoio Financeiro:** INCA/MS/FAF

038**IMPORTÂNCIA DA PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA REATIVAÇÃO DO HCMV EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**Peres RMB¹, Andrade PD¹, Bonon SHA¹, Franco JC¹, Alves WR¹, Costa SRC¹, Vigorito AC¹, Aranha FJP¹, Souza CA¹, Costa SCB¹¹Universidade Estadual De Campinas - UNICAMP

Introdução: As infecções são uma das principais complicações do TCTH, e a principal causa de óbito. Estas infecções ocorrem como resultado da profunda depressão na imunidade, causada por múltiplos fatores, principalmente pelo regime de condicionamento e tratamentos de prevenção da DECH. Dentre as infecções de etiologia viral, os agentes que assumem maior relevância como causadores de doença em receptores de TCTH são os da família Herpesviridae, entre eles o HCMV. No Brasil, mais de 90% da população apresenta anticorpos específicos para o HCMV, evidenciando infecção pregressa. Em situações de imunodepressão, como ocorre após o TCTH, é freqüente a reativação da infecção

latente causada pelo HCMV. A reativação do HCMV ocorre com maior frequência entre os dias +30 e +120 pós-TCTH. Devido ao grande impacto que o HCMV pode causar em pacientes submetidos ao TCTH o diagnóstico precoce desta reativação é imprescindível. A antigenemia é considerada o padrão ouro para este diagnóstico. Entretanto este método não é possível de ser realizado em amostras com grave neutropenia, frequentemente vista nos primeiros dias pós-TCTH. Este problema é facilmente solucionado com a introdução da PCR em tempo real. Esta técnica permite a detecção precoce da infecção ativa pelo HCMV em amostras neutropênicas, além da monitorização rigorosa da resposta aos medicamentos antivirais, previsão do risco de viremia e recaída ao tratamento, o surgimento de cepas resistentes e eventual doença por HCMV. **Objetivos:** Padronizar e validar o protocolo da PCR em tempo real para o diagnóstico da reativação do HCMV e determinar o cutoff para guia o tratamento precoce com ganciclovir, na intenção de reduzir o número de pacientes que desenvolvem infecção ativa e doença por HCMV, complicações associadas às mesmas, duração do tratamento antiviral além do número de pacientes submetidos a tratamentos desnecessários ou tardios. **Metodologia:** O presente estudo encontra-se em andamento. A construção da curva padrão absoluta foi realizada a partir do produto amplificado da cepa AD169 pela PCR e posterior clonagem em células competentes. A validação da técnica foi feita baseada em testes de especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade. O cutoff será calculado a partir da curva ROC (antigenemia x PCR em tempo real). Paralelamente, DNAs estão sendo extraídos de leucócitos totais de pacientes submetidos ao TCTH entre os dias +0 e +150 pós-TCTH. **Resultados:** A especificidade dos primers e sonda utilizados foram testados com culturas virais e controles positivos de todos os Herpesvirus Humanos (HHV1 – HHV8). Somente a cepa AD169 (HCMV) apresentou curva de amplificação e banda positiva na eletroforese, comprovando esta especificidade. A curva padrão absoluta foi construída a partir de 6 pontos de diluição 1:10 (107 – 102) em triplicata obtendo-se eficiência de 0,93 e R2 igual a 0,9998. Várias amostras foram testadas em triplicatas em diferentes corridas, observando-se diferença mínima entre os CTs, comprovando a reprodutibilidade dos resultados. As amplificações pela PCR em tempo Real já começaram a ser feitas nos DNAs estocados que foram extraídos do sangue dos pacientes. **Conclusão:** Até o presente momento 93 amostras foram submetidas à amplificação pela PCR em tempo real, observando concordância com os resultados da antigenemia.

039

ESTUDO COMPARATIVO DA VIABILIDADE CELULAR DOS LEUCÓCITOS E DAS CÉLULAS CD34+ EM DIFERENTES AMOSTRAS.

Justus JP¹, Bach S¹, Malvezzi M¹, Azambuja AP¹, Rocha MT¹, Schluga Y¹, Novello E¹, Silva N¹, Martins E¹, Beltrame MP¹

¹Hospital de Clínicas - UFPR

A célula-tronco hematopoética (CTH) tem enorme potencial para reconstituir o sistema hematopoético, o que permitiu o desenvolvimento de estratégias de terapias celulares para doenças neoplásicas ou não. O número de células CD34+ se tornou um dos principais parâmetros de controle de qualidade do enxerto, para transplantes alogênicos e autólogos. Este estudo descreve a análise da viabilidade celular dos leucócitos e das células CD34+, seguindo a plataforma de ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering), além da correlação das células CD34+ com a literatura. Este estudo foi realizado no Lab. de Citometria de Fluxo do HC/UFPR-Curitiba. Foram analisadas 100 amostras de medula óssea (MO) e conc. de células-tronco periféricas (CTHP) e 50 amostras de sangue de cordão umbilical (SCU). Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, medianas, valores mínimos,

valores máximos. Para a comparação dos materiais em relação à quantificação de CD34+, viabilidade total e viabilidade das células CD34+ considerou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para a avaliação da associação entre estas variáveis foi estimado o coeficiente de correlação de Spearman. Valores de p<0,05 indicaram significância estatística. As médias da viabilidade total foram; MO 98,2%, CTHP 98,0% e SCU 86,5%; as médias da viabilidade na janela CD34+ foram; MO 95,0%, CTHP 98,1% e SCU 97,0% e as medianas da variável CD34 foram; MO 4,72x106/Kg, CTHP 7,10x106/Kg e SCU 3,69x105/Kg. Nossos resultados são semelhantes aos achados da literatura, valores de referência (média) para "pega"= 1,2 105/kg (Laughlin et al., 2001) e a variável viabilidade na janela CD34+ foi relevante para as amostras de SCU. Este estudo concluiu que as amostras de medula óssea demonstraram melhor viabilidade celular e as amostras de sangue de cordão umbilical mostraram maior índice de apoptose, resultado esperado por se tratar de amostras com diferentes processos de manipulação. O estudo da viabilidade total e viabilidade das células CD34+ das amostras de CTHP e SCU revelou a importância da análise ou quantificação da viabilidade das células CD34+, nessas duas amostras e não apenas da viabilidade total. Concluímos que nas amostras de SCU que mostraram viabilidade total com valores percentuais baixos, não sofreu influência na viabilidade das células da janela CD34+, sendo estas aproximadamente 10% mais viáveis. Assim, é fundamental a adequada manipulação das amostras, principalmente aquelas que são submetidas à criopreservação. É importante salientar, que há necessidade de mais estudos para avaliar se os pacientes que receberam amostras com baixa viabilidade celular e/ou baixo número de células CD34+, obtiveram menor sobrevida ou falha da enxertia.

040

INFLAMOSSOMA: INVESTIGAÇÃO DE SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO AGUDA

Ferreira GL¹, Pizzatti L¹, Barbosa R¹, Bouzas LF¹, Abdelhay E¹

¹Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) - Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Introdução: A Doença enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHA) é uma grave complicação do transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) alogeneico e a principal causa de morbidade e mortalidade nos pacientes submetidos a esta terapia. Os modelos da DECHA tem mostrado que essa doença se caracteriza por seu estado inflamatório e todos os estudos dos mecanismos da DECHA tem se baseado em populações celulares capazes de ativar ou regular o sistema imune. Mais recentemente estratégias proteômicas tem sido aplicadas com o intuito de identificar moléculas que possam explicar os processos biológicos que levam à DECHA. O plasma é a fonte principal escolhida para a identificação de biomarcadores circulantes. Portanto a identificação e quantificação absoluta de proteínas e peptídeos diferencialmente expressos no plasma de pacientes que desenvolveram DECHA é de extrema importância por representar uma nova estratégia de diagnóstico precoce e menos invasiva do que as biópsias dos órgãos acometidos. **Objetivo:** Comparar e quantificar o perfil de expressão proteica do plasma de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) submetidos ao TCTH alogeneico no Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO – INCA) que desenvolveram DECHA com pacientes que não desenvolveram DECHA. **Materiais e Métodos:** Neste estudo, foram analisadas amostras de plasma do dia D+45, categorizadas em Pools, de 31 pacientes submetidos ao TCTH alogeneico e que tinham como doença de base LMA: 20 pacientes desenvolveram DECHA e 11 pacientes não desenvolveram DECHA. As amostras foram concentradas 16x com colunas de 3k amicon (Millipore), digeridas em solução e analisadas por cromatografia multidimensional (MUD-PIT) no sistema de espectrometria de massas 2D-NanoESI-MSE

(MudPIT) utilizando o espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters). As proteínas foram identificadas e quantificadas utilizando o software Proteinlynks global Server (Waters) com a ferramenta Expression E.

Resultados e Conclusões: Através das análises proteômicas foram identificadas 161 proteínas, 90 dessas proteínas apresentaram-se diferencialmente expressas (65 com a expressão aumentada e 25 com a expressão diminuída). Dentre as proteínas identificadas como superexpressas, destacamos NALP12 e NFkB, integrantes do complexo inflamatório. O inflamatório é um complexo multiproteico que medeia a ativação de caspase 1, o qual promove a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18. A expressão diferencial da proteína NALP12 no plasma e em células mononucleares de cada paciente foi validada por western blot e RTq-PCR tempo real. Além disso, a citocina pró-inflamatória IL-1 β , também foi avaliada por western blot nos mesmos pacientes. Baseado em estudos que avaliaram a relação entre a variabilidade interindividual de genes que codificam proteínas do inflamatório e o desfecho do TCTH alogeneico, investigamos o screening de mutação de NALP2, NALP3 e NALP12 em nossos pacientes. Nossos resultados apontam o complexo inflamatório como um relevante mecanismo no desenvolvimento e manutenção da DECHa. **Apoio Financeiro:** INCA / Ministério da Saúde/ CNPQ / FINEP

041

A UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DA SINDROME MIELODISPLÁSICA

Diniz C¹, Gomes B¹, Campos MM¹, Lima LG¹, Cascabulho CM¹, Abdelhay E¹

¹Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) - Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Introdução: As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo de doenças clonais das células progenitoras hematopoiéticas, caracterizadas por alterações na diferenciação celular, presença de citopenias periféricas, apoptose excessiva intra-medular e aumento do risco de desenvolver Leucemia Mielóide Aguda. Embora a Citomorfologia, a Histopatologia e a Citogenética constituam parte importante na caracterização desta doença, fornecendo informações para o diagnóstico e definição de prognóstico, o uso da Citometria de Fluxo (CF) na identificação das alterações celulares tem sido muito útil na discriminação entre a medula óssea (MO) reacional e a SMD. Recentes estudos vêm mostrando a ocorrência de múltiplas e variáveis anormalidades fenotípicas nas SMD que, quando identificadas contribuem para a estratificação prognóstica da doença. Essas alterações incluem: aumento ou diminuição do número de mieloblastos, diminuição da granularidade das células mielóides, expressão assíncrona de maturação associada à presença de marcadores anômalos, a falta ou a diminuição da expressão de antígenos mielóides, dentre outras. **Objetivo:** Determinar a importância da CF no diagnóstico e na estratificação de risco no prognóstico da SMD. **Materiais e Métodos:** Neste estudo, foram avaliados através da CF (FACSCAN –BD), os padrões de maturação e diferenciação das células da MO de 138 pacientes com SMD, oriundos do Estado do Rio de Janeiro, no período de Janeiro/2006 à Maio/2012, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). O painel abaixo descrito foi capaz de identificar alterações fenotípicas dos compartimentos da MO estudados: CD4/CD8/CD45 – CD2/CD56/CD45 – CD19/CD10/CD45 – CD19/CD34/CD45 – CD20/CD10/CD19 – CD34/CD33/CD7 – CD16/CD13/CD45 – CD11b/CD13/CD45 – CD16/CD11b/CD45 – CD15/HLA-DR/CD45 – CD14/CD64/CD45 – CD36/CD64/CD45 – CD45/HLA-DR/CD123 – CD71/CD235a/CD45 – CD61/CD42b/CD45. Para a análise dos dados foi utilizado o software Paint-a-gate. **RESULTADO:** As principais alterações encontradas foram: ausência ou diminuição das células precursoras linfóides B, diminuição do número de células CD34+

aumento das células CD117+ no compartimento eritróide associada a presença de displasia, presença de fenótipos aberrantes na população de monócitos e granulócitos, assincronismo de maturação na população de granulócitos com diminuição da população celular mais indiferenciada (mieloblasto e promielócito) e aumento da população mais diferenciada (mielócito e metamielócitos), diminuição do número de células monocíticas e alteração no seu padrão maturativo. **Conclusão:** A desregulação clonal da hematopoiese é traduzida nas alterações maturativas e consequentes citopenias que ocorrem nos pacientes com SMD. As inúmeras alterações fenotípicas encontradas simultaneamente nos pacientes com SMD através da CF constituem achados importantes na discriminação entre uma MO reacional e a SMD, além de fornecer critérios diagnósticos para estratificação dos pacientes com risco de transformação leucêmica. **Financiamentos:** FINEP, FAPERJ, CNPQ, Ministério da Saúde.

042

PERFIL HEMATOLÓGICO DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Angeli MH¹, Araújo AB¹, Schmalfluss T¹, Furlan JM¹, Salton GD¹, Röhsig LM¹

¹Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, Serviço de Hemoterapia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

O processamento do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) em bancos públicos para uso alogênico não-aparentado compreende várias etapas de triagem para qualificação do material. A contagem de células sanguíneas é uma das primeiras etapas realizadas nos laboratórios de processamento dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP), sendo que a avaliação do número de células nucleadas totais (CNT) ou celularidade inicial é decisiva para o aproveitamento do material para armazenamento. Conforme a legislação vigente para BSCUP (RDC 56/10), o número de CNT da unidade de SCUP para processamento deve ser igual ou superior a 5 x 10⁸. O BSCUP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) integra a rede pública brasileira de SCUP (BrasilCord), a qual considera 7,5 x 10⁸ como o valor mínimo de celularidade inicial para o processamento da unidade. O objetivo deste trabalho é apresentar o perfil hematológico de SCUP coletados no HCPA no período de julho de 2011 a junho de 2012. Foi realizado um estudo retrospectivo de 400 amostras baseado no levantamento de dados do software da Rede BrasilCord, considerando os seguintes parâmetros: volume inicial da unidade (SCUP e anticoagulante), celularidade inicial da unidade, contagem inicial de células nucleadas totais/ μ L, linfócitos/ μ L, monócitos/ μ L, granulócitos/ μ L, plaquetas/ μ L e hematócrito. As contagens celulares foram realizadas no equipamento Mindray BC2800. A quantificação de células CD 34+/ μ L na amostra final a ser congelada (buffy-coat) foi analisada em 295 unidades, pois amostras com celularidade inferior ao ponto de corte não foram avaliadas para este parâmetro. Para verificar a normalidade dos dados foi realizado o teste Shapiro-Wilk com nível de significância de 5%. Dados com distribuição normal foram representados por média e desvio padrão e dados sem distribuição normal foram descritos por mediana e intervalo interquartil. Também foram apresentados os valores mínimo e máximo de cada parâmetro. O volume das unidades (mL) recebidas no laboratório de processamento do BSCUP/HCPA variou de 24,10 a 219,50 - média 106,96 ($\pm$ 30,92); celularidade inicial variou de 0,70 a 48,10 x 10⁸ - mediana 11,27 x 10⁸ (7,82-15,90); número de CNT/ μ L variou de 1900 a 60800 - mediana 10850 (8700-13480); número de linfócitos/ μ L de 480 a 39900 - mediana 4350 (3500-5400); número de monócitos/ μ L variou de 100 a 7100 - mediana 700 (600-1000); número de granulócitos/ μ L variou de 800 a 36700 - mediana 5600 (4325-7200); número de plaquetas/ μ L variou de 1000 a 334000 - mediana 187500

(156000-219000) e hematócrito (%) variou de 11,80 a 69,00 - mediana 36,80 (32,50-41,40). A quantificação de células CD 34+/ μ L no produto final variou de 12,40 a 703,60 - mediana 108,20 (69,70-178,00). Verificou-se ampla variação entre os valores mínimos e máximos em todos os parâmetros avaliados. Considerando os valores de referência para SCUP utilizados pelo HCPA, ocorreram amostras com valores inferiores em todos os parâmetros avaliados, enquanto valores superiores foram observados apenas em alguns parâmetros. Os valores inferiores aos de referência podem ser decorrentes do baixo volume de algumas unidades, o que ocasiona a diluição do sangue com o anticoagulante. Amostras com valores superiores ao de referência foram analisadas, individualmente, como possível indicativo de alteração patológica.

043

RELAÇÃO ENTRE VOLUME E CELULARIDADE EM UNIDADES DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE PLACENTÁRIO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE (HCPA)

Araújo AB¹, Furlan JM¹, Schmalfluss T¹, Angeli MH¹, Salton GD¹, Röhsig LM¹

¹Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, Serviço de Hemoterapia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

A quantificação de células nucleadas totais (CNT) ou celularidade inicial da unidade é uma das etapas qualificatórias para o processamento e armazenamento do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP). A RDC 56/2010, legislação para Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP), determina que unidades de SCUP para processamento possuam celularidade mínima de 5×10^8 . O BSCUP/HCPA, como integrante da Rede BrasilCord, utiliza $7,5 \times 10^8$ de celularidade inicial como ponto de corte para o processamento de SCUP, sendo que unidades com celularidade inferior são desprezadas. Este estudo objetiva verificar a relação entre volume e celularidade iniciais das unidades de SCUP coletadas no HCPA de julho/2011 a junho/2012. Foi realizado estudo retrospectivo no software BrasilCord com coleta de dados de volume (sangue e anticoagulante) e celularidade inicial de 400 unidades de SCUP. Considerando $7,5 \times 10^8$ como ponto de corte para celularidade inicial, identificou-se um limite inferior de volume, onde abaixo deste todos os valores de celularidade são inferiores ao ponto de corte, e um limite superior de volume, a partir do qual todos os valores de celularidade são iguais ou superiores ao ponto de corte. As amostras foram categorizadas em cinco grupos de volume: 0-70mL (1), 70,1-90mL (2), 90,1-110mL (3), 110,1-130mL (4) e >130,1mL (5) e, em cada grupo, foram analisados a quantidade de amostras, o número de amostras com celularidade inferior e superior ao ponto de corte e a associação entre volume e celularidade. Foram utilizados os testes Shapiro-Wilk, Correlação de Spearman e Qui-quadrado para verificar a normalidade da distribuição, correlação e associação dos dados, respectivamente. Observou-se forte correlação positiva ($r_s=0,820$; $p<0,01$) entre as variáveis celularidade e volume iniciais da unidade. Das 400 amostras, 309 (77,25%) apresentaram celularidade inicial $\geq 7,5 \times 10^8$ e 91 (22,75%) foram desprezadas por baixa celularidade inicial. Os limites inferior e superior de volume para o ponto de corte $7,5 \times 10^8$ foram 61,3 e 114,8mL, respectivamente, sendo que ocorreram 26 amostras com volume abaixo do limite inferior e 155 amostras com volume acima do limite superior. Das 219 amostras com volume entre 61,3-114,8mL, 65 (29,7%) apresentaram baixa celularidade e 154 (70,3%) apresentaram celularidade igual ou superior a $7,5 \times 10^8$. Analisando os grupos categorizados por volume, o grupo 1 foi composto por 50 amostras (44 com celularidade $< 7,5 \times 10^8$ e 6 com celularidade $\geq 7,5 \times 10^8$), grupo 2 por 69 amostras (30 com celularidade $< 7,5 \times 10^8$ e 39 com celularidade $\geq 7,5 \times 10^8$), grupo 3 por 105 amostras (16 com celularidade $< 7,5 \times 10^8$ e 89 com celularidade $\geq 7,5 \times 10^8$), grupo 4 por 88 amostras (1 com

celularidade $< 7,5 \times 10^8$ e 87 com celularidade $\geq 7,5 \times 10^8$) e grupo 5 por 88 amostras (todas com celularidade $\geq 7,5 \times 10^8$). Nos grupos 1 e 2 observou-se associação positiva entre o volume e a celularidade inferior ao ponto de corte; nos grupos 3, 4 e 5 foi encontrada associação positiva entre volume e celularidade igual ou superior ao ponto de corte. O conhecimento da forte associação entre volume e celularidade permite presumir a celularidade de uma unidade a partir de seu volume inicial, auxiliando na escolha da ordem da manipulação das amostras e do tipo de processamento (manual e automatizado), a fim de otimizar a rotina do BSCUP.

044

AValiação DA RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA EM TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO-HEMATOPOÉTICAS DE MEDULA ÓSSEA, EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI, SUBMETIDOS A REGIME CONDICIONAMENTO MIELOABLATIVO

Beltrame MP¹, Covas DT², Perlingeiro R³, Malvezzi M¹, Azambuja AP¹, Schluga Y¹, Novello E¹, Silva N¹, Justus JP¹, Pasquini R¹

¹Hospital de Clínicas - UFPR

²USP- Ribeirão Preto - SP

³University of Minnesota - EUA

Introdução: A Anemia Aplástica Severa é caracterizada pela falência do processo de hematopoese, potencialmente fatal, caracterizada por uma depleção nas reservas medulares acompanhada de anemia grave, neutropenia e trombocitopenia. O paciente com aplasia de medula não produz suficientemente as células do sangue e por isto, frequentemente recebe transfusões, seja de concentrado de hemácias (para correção de anemia grave) ou de plaquetas (em caso de sangramentos). A diminuição dos glóbulos brancos leva à diminuição das defesas do organismo causando infecções frequentes. O transplante alogênico de células hematopoiéticas (TCH) continua a ser o único tratamento que pode corrigir as manifestações hematológicas em pacientes com anemia de Fanconi. A fim de evidenciar a importância dos marcadores linfocitários para monitorizar a recuperação imunológica após alloHCT na área clínica, estudamos a recuperação imune em 24 pacientes durante um ano pós TMO. **Material e Métodos:** A idade média dos pacientes foi de 9,6 anos e do grupo controle 7,6. Foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo para avaliar os linfócitos T, B e NK no sangue periférico e medula óssea, além da pesquisa das citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, TNF e INF) em amostras de soro. O seguimento foi nos dias D +30, D+60, D+100, D+180, D+270, D+360. Foram quantificados os seguintes marcadores: CD3, CD4, CD8, CD10 CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD27, CD28, CD31, CD38 CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD57, CD69, CD95, CD127 CD152, CD154, CD178, FOXP3, TCRsb, TCRgs. **Resultados:** Dos 24 pacientes estudados, dois foram a óbito. Vinte e dois pacientes mostraram aumento dos linfócitos CD3+CD4+ em relação as amostras pré-transplante ($P<0,05$), porém no D+360 os valores não atingiram o grupo controle ($p<0,001$). Quanto aos linfócitos B houve aumento significativo, $p=0,03$ com relação as amostras pré, porém inferior aos achados do grupo controle ($P=0,005$). Quanto aos linfócitos NK, houve semelhança com o grupo controle ($P=0,265$), mesmo um ano pós transplante. Quanto aos linfócitos Treg (CD4+CD25++CD127+FOXP3+), mostraram valores menores comparados ao controle ($p=0,042$) e quando correlacionamos com as amostras pré-transplante, houve um aumento destas células ($p=0,005$). As análises das citocinas séricas mostraram aumento de TNF até o D+100 e Interferon γ no D+30. Houve diminuição de IL-10 a partir do D+100. A IL-17 aumentou no D+360 ($p=0,022$). Quanto a IL-2 e IL-4, não houve diferença significativa quando comparamos com as amostras pré-transplante. **Conclusão:** Sabe-se que a maioria das complicações ocorrem durante os primeiros quatro meses após o trans-

plante, devido às alterações potenciais em múltiplos órgãos, quer por a toxicidade de condicionamento, por infecções, desordens do sistema imunológico do processo, por alterações no sistema hematopoiético e ao uso intensivo de múltiplas medicações. A utilização de biomarcadores como uma ferramenta para monitorar este grupo de pacientes pode prever a resposta ao tratamento e predizer o risco de doença do enxerto-versus-hospedeiro.

045

BETAHERPESVIRUS INFECTIONS AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION (HSCT): DETECTION AND MONITORING OF ACTIVE INFECTIONS USING ANTIGENEMIA ASSAY AND PLASMA NESTED-PCR

Pancielli PN¹, Gullin AC¹, Oliveira RS¹, Vigorito AC², Souza CA², Jr VCAF², Peres RMB¹, Rossi CL³, Costa SCB¹, Bonon SHA¹

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

²Bone Marrow Transplant Unit, Hemocenter, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

³Department of Clinical Pathology, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Introduction: Cytomegalovirus (CMV), herpesvirus 6 (HHV-6) and herpesvirus 7 (HHV-7) are human betaherpesviruses, cause frequent complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), and are the major cause of opportunistic infections, increased morbidity and mortality in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Among these complications are problems such as interstitial pneumonia, gastritis, encephalitis and chronic graft versus host disease (GVHD). To minimize the possible clinical manifestations caused by these herpesviruses in the post-transplant period, it is necessary to use techniques for the rapid diagnosis and early treatment of these infections with the initiation of ganciclovir which is triggered by the detection of virus reactivation, currently the standard strategy for preventing CMV disease. **Objectives:** Given the above, the main objectives of this study are: to standardize the use of antigenemia (AGM) assay in detecting active infection caused by HHV-6 and HHV-7 in patients undergoing HSCT; to monitor prospective patients undergoing HSCT, in relation to active infections caused by betaherpesvirus, using antigenemia assays and nested-PCR (N-PCR) to evaluate the clinical impact caused by these viruses and coinfection among them. **Methods:** Thirty-five patients undergoing HSCT were monitored weekly, from day 0 until day 100 in the post-transplantation period, using antigenemia assays and N-PCR for the detection of active infection caused by the betaherpesvirus studied. HHV-6 and HHV-7 antigenemia assays were developed in peripheral blood mononuclear cells with the use of monoclonal antibodies which are specific for these viruses and peroxidase staining. Active CMV infection detection was performed using a commercial kit (Iq Products) by immunofluorescence staining and quantification of CMV-pp65 positive cells. **Results:** Using N-PCR, twenty-six out of the 35 patients monitored had active infections caused by HCMV, HHV-6 and HHV-7, respectively in 26/35 (74.3%), there was a median of 35 days after transplantation (range 7-87 days), 13/35 (37.14%) with a median of 35 days after transplantation (range 11-75 days) and 19/35 (54.3%) with a median of 20 days after transplantation (range 0-87 days). Active infection detection using antigenemia assay for HCMV, HHV-6, HHV-7 occurred, respectively, in 16/35 (45.7%) with a median of 40.5 days (range 0-90 days), 19/35 (54.3%) with median of 47 days (range 21-89 days) and 22/35 (62.8%) with a median of 25 days (range 0-74 days). **Conclusion:** As a preliminary conclusion, the standardization and development of the HHV-6 and HHV-7 antigenemia assay and N-PCR using plasma in neutropenic patients appear to be effective in the

diagnosis of active infections caused by these herpesviruses and showed that the onset of the reactivation of these infections is very common in HSCT patients, including coinfections and these infections are closely related to CMV infection. However, the clinical significance of these findings requires further investigation.

046

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR SOBRE A RECUPERAÇÃO HEMATOPOÉTICA EM PACIENTES SUBMETIDOS À TRANSPLANTE AUTÓLOGO

Bardi MS¹, Gelinski JR¹, Silva DLD¹, Ciappina R¹, Colluco NM¹, Prado FMLN¹, Lavado EL¹, Faune CC¹, Trigo FC¹, Martins LNG¹, Ciocari J¹

¹Universidade Estadual de Londrina-Hospital Universitário

Introdução: O número estimado de células CD34+/kg do paciente tem sido o indicador mais importante para a adequada recuperação da hematopoese nos transplantes autólogos, mas há controvérsias quanto à concentração ideal de células a serem infundidas. Estudos recentes observaram que concentrações de CD34+ menores que 5x10⁶/kg produzem enxertia neutrofilica, mas, expõem alguns pacientes a reconstituição plaquetária tardia. As células progenitoras estão em número reduzido na circulação periférica, sendo necessário mobilizá-las através de fatores de crescimento hematopoéticos recombinantes (G-CSF, GM-CSF e outros). Quimioterapia e fatores de crescimento utilizados sequencialmente, possibilitam coletar quantidade suficiente dessas células por leucaférese. **Objetivo:** Avaliar a influência do número de células criopreservadas na recuperação hematopoética (neutrofilica e plaquetária) em pacientes submetidos à transplante autólogo. **Método:** Vinte e oito pacientes foram submetidos ao procedimento de leucaférese após processo de mobilização. A proporção de células CD34+ foi identificada por análise em citômetro de fluxo (Facs Calibur) utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados com substâncias fluorescentes. O processamento das bolsas de CTH-SP foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pelo laboratório. Foi distribuído em cada bolsa 50 mL de concentrado de CTH-SP e 50 mL de solução crioprotetora, obtendo-se proporção final de 10% de DMSO. A avaliação da viabilidade foi feita pelo teste de azul de trypan no pré-congelamento (após adição da solução crioprotetora) e no pós-congelamento (antes da infusão). As bolsas foram imediatamente acondicionadas em canister e armazenadas em freezer -86°C. Para avaliar a recuperação hematopoética, as concentrações de células nucleadas/mL foram categorizadas em dois grupos: A (2,0-2,8x10⁸células/mL) e B (2,8-3,6x10⁸células/mL) e as doses de CD34+/kg em três grupos: A (0,75-2,5x10⁶/kg), B (2,5-5,0x10⁶/kg) e C (≥5,1 x10⁶/kg). Os resultados foram analisados pelo software SPSS v. 15.0, sendo os dados resumidos pela mediana e quartis. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e a correlação feita pelo teste de Spearman ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Não foi encontrada diferença significativa entre a concentração de células nucleadas e a recuperação de neutrófilos e plaquetas nos dois protocolos utilizados. O tempo mediano para recuperação dos neutrófilos e plaquetas nos protocolos A e B (concentração de células nucleadas) foi de 11 e 11 dias (p=0,605) e 12 e 14 dias (p=0,254), respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa entre a dose de CD34+/kg e a recuperação hematopoética nos três grupos avaliados. O tempo mediano para recuperação dos neutrófilos nos grupos A, B e C (dose de CD34+/kg) foi de 11, 11 e 11 dias (p=0,370) e para plaquetas de 11, 12,5 e 12 dias (p=0,234), respectivamente, havendo correlação (coeficiente=0,373) entre a dose de CD34+ e a recuperação de plaquetas (p=0,05). **Conclusão:** As diferentes concentrações de células nucleadas e de CD34+ avaliadas não interferiram na recuperação hematopoética. Com base nos dados obtidos, levanta-se a possibilidade de criopreservar maior concentração celular/bolsa, reduzindo o custo do procedimento, bem como do volume de DMSO a ser infundido no paciente resultando em menor toxicidade.

047

IMPACTO DO AUMENTO NO NÚMERO MÍNIMO DE CÉLULAS NUCLEADAS TOTAIS (TNC) PARA CONGELAMENTO DE UNIDADES DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO NO APROVEITAMENTO DAS UNIDADES COLETADAS

Arrais CA¹, Pinheiro CCG¹, Theodoro EC¹, Silva RC¹, Jr AM¹*¹Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário - Hospital Sírio Libanês*

Introdução: Embora a RDC 56 de 16 de dezembro de 2010 defina que uma unidade de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) para uso alogênico não aparentado pós processamento deva ter um número total de células nucleadas (TNC) igual ou superior a 5×10^8 para ser congelada, desde maio de 2011, o Banco de SCUP do Hospital Sírio Libanês (HSL) passou a utilizar o número de TNC mínimo de $7,2 \times 10^8$ para considerar apta a unidade para congelamento. Além disso, o BSCUP do HSL adota como indicadores de qualidade, entre outros, o percentual de unidades coletadas que não preencheram critérios para processamento e o percentual de unidades processadas que não preencheram critérios para congelamento, cujas metas são $\leq 50\%$ e $\leq 15\%$, respectivamente. **Objetivo:** Avaliar o impacto que o aumento do parâmetro mínimo de TNC para congelamento das unidades de SCUP gerou no índice de aproveitamento das unidades coletadas e nos indicadores de qualidade estabelecidos. **Material e Métodos:** De janeiro a abril/2011, utilizando um número TNC igual ou superior a 5×10^8 células como parâmetro mínimo para congelamento, 68% (68/100) das unidades coletadas foram congeladas. De maio/2011 a Abril/2012, após incremento do parâmetro mínimo para $7,2 \times 10^8$, obtivemos um aproveitamento de 57% (378/663) das unidades coletadas. **Conclusão:** Apesar do incremento no parâmetro mínimo de celularidade para congelamento das unidades de SCUP adotado a partir de maio/2011 ter levado a uma queda de 11% no aproveitamento das unidades coletadas, ainda assim conseguimos manter a nossa meta neste indicador de qualidade, e passamos a oferecer produtos que possibilitam uma dose celular mínima suficiente para realização de transplante em pacientes adultos. A partir desses dados, consideramos que será possível um incremento ainda maior no parâmetro mínimo de TNC para congelamento das unidades, sem comprometer a meta do indicador de qualidade correspondente.

048

DESCARTE DE UNIDADES DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO (SCUP) PARA USO ALOGÊNICO NÃO APARENTADO DEVIDO A SOROLOGIA PARA HTLV I/II.

Arrais CA¹, Martins RM¹, Theodoro EC¹, Mendrone A¹*¹Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário - Hospital Sírio Libanês*

Introdução: Em São Paulo, a taxa global de descarte de unidades de sangue total por sorologia e devido teste reagente por HTLV I/II é de aproximadamente 3% e 0,06%, respectivamente. A maioria das candidatas à doação de SCUP para uso alogênico não aparentado passa por uma triagem de doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue, incluindo citomegalovírus e toxoplasmose, como parte dos exames pré-natais. As gestantes que apresentam alguma alteração de importância clínica nesses marcadores não são qualificadas para doação de SCUP. Entretanto, no Brasil, a triagem sorológica para o HTLV I/II ainda não faz parte da rotina dos exames pré-natais. Por esta razão, gestantes por-

tadoras do vírus HTLV I/II podem ser selecionadas para doação de SCUP. O HTLV I/II pode ser transmitido para o RN durante a gestação, no parto e, principalmente, pela amamentação – esse risco se situa entre 13% a 22% e se renova a cada exposição da criança ao seio materno. O objetivo desta análise foi avaliar a taxa de descarte de SCUP devido teste reagente para HTLV I/II, o qual pode ser considerado como um índice de prevalência desta infecção em gestantes da cidade de SP. **Casística e Métodos:** Um total de 401 amostras maternas foi coletado pelo Banco de SCUP do Hospital Sírio Libanês no período de janeiro/2011 a maio/2012. As amostras foram submetidas a triagem sorológica para Anti-HIV1/2, Anti-HCV, HbsAg, Anti-HBc, Anti-HTLV I/II, Chagas, Sífilis, Citomegalovírus (CMV) e Toxoplasmose. Também foram realizados HBV-DNA-NAT, HCV-RNA-NAT, HIV-RNA-NAT. Western Blot (WB) foi utilizado para confirmação da infecção pelo HTLV I/II. **Resultados:** Das 401 amostras avaliadas, 13 (3,2%) apresentaram testes sorológicos de importância clínica reagentes: 02 (0,5%) Anti-HBc; 02 (0,5%) Toxoplasmose IgM; 04 (1%) CMV (IgM); 01 Anti-HCV indeterminado e 04 (1%) para HTLV I/II. Todas as unidades de SCUP correspondentes foram descartadas. Não encontramos nenhuma sorologia reagente para HIV, Sífilis, Chagas, e HbsAg, assim como não tivemos nenhum teste molecular alterado. Das 04 gestantes com teste alterado para HTLV I/II, 02 (0,5%) tiveram a infecção confirmada por WB. **Conclusão:** A análise destes dados mostra que o emprego de testes para identificar a infecção pelo HTLV-I/II no pré-natal em gestantes da cidade de SP é justificável. O pré-natal é uma excelente oportunidade para o diagnóstico e tratamento de infecções maternas e redução dos riscos de transmissão à criança. Maior atenção e medidas educativas para as gestantes poderiam ser adotadas com o objetivo de reduzir os riscos, poupando recursos e garantindo qualidade da atenção à saúde materno-infantil.

049

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS CD34+ UTILIZANDO CITÔMETRO DE FLUXO ACCURI C6: RESULTADO PRELIMINAR DE VALIDAÇÃO

Morais CCPL^{1,2}, Pinto JDA^{1,2}, Cascabulho CM^{1,2}, Thiago LS^{1,2}, Lima LG^{1,2}, Nery PS^{1,2}, Bouzas LF^{1,2}, Paraguassú-Braga FH^{1,2}*¹Instituto Nacional de Câncer**²Centro de Transplante de Medula Óssea*

Introdução: A literatura relata que o número de células CD34+ infundida é considerado um fator prognóstico importante relacionado à "pega" do enxerto no transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Assim, o uso da citometria de fluxo tem se tornado indispensável na prática clínica e laboratorial para a identificação e quantificação dessas células. **Objetivo:** Realizar a validação do sistema Accuri C6® (BD Accuri cytometers) para a quantificação de CTH CD34+ por comparação interlaboratorial de resultados obtidos através do sistema FacsCan (BD, San Jose, Califórnia), com estratégia de aquisição e análise previamente validadas. **Material e Métodos:** Foram avaliadas 41 amostras de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP). Após análise e quantificação de células CTH CD34+ realizadas pelo sistema FacsCan no Laboratório de Imunologia, as amostras foram encaminhadas ao Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) para análise e quantificação das células através do sistema Accuri C6®. A quantificação das CTH CD34+ foi realizada através do protocolo ISHAGE, plataforma dupla, em ambos os laboratórios. O número de células nucleadas totais foi obtido através do contador hematológico ABX Micros 60 (Horiba Ltda, São Paulo, SP, Brasil). **Resultados:** Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 5. 03. As análises por regressão linear apresentaram uma boa correlação tanto no número de células CD34+/mm³ como no número de células CD34+

totais ($r^2=0,96$, em ambas as análises) quando comparado Accuri C6® versus Facscan. As medianas apresentadas foram de 120,3/mm³ (variação de 37,8 – 484,0/mm³) e 2,4x10⁶ células CD34+ totais (variação de 0,8 – 10,0x10⁶) para o sistema Accuri C6®. Para o Facscan, as medianas foram de 120,8/mm³ (variação de 26,3 – 540,3/mm³) e 2,4x10⁶ células CD34+ totais (variação de 0,5 – 11,0x10⁶). Entretanto, a análise por regressão linear não mostrou uma boa correlação no percentual da população CD34+ ($r^2=0,29$), quando comparado os sistemas Accuri C6® versus Facscan, apresentando medianas de 0,14% (variação de 0,02 – 0,41%) e 0,3% (variação de 0,05 – 0,85%), respectivamente, o que se deve a particularidades do software de análise utilizado para cada sistema. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que o sistema Accuri C6 segue critérios importantes para a rotina clínica e laboratorial de quantificação de CTH CD34+, como: simplicidade, permitindo a aplicação da técnica; alta sensibilidade, por ser capaz de detectar eventos raros como as CTH; precisão, promovendo resultados clinicamente relevantes; reprodutividade, promovendo resultados confiáveis e rapidez, promovendo análise em tempo real.

050

DIMETILSULFÓXIDO PODE SER REMOVIDO COM SEGURANÇA DA MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGA CRIOPRESERVADA PARA REDUZIR A TOXICIDADE ASSOCIADA À INFUSÃO – EXPERIÊNCIA DO INSTITUTO DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA-GRAACC-UNIFESP

Félix OMWO¹, Simões PC¹, Silva AG¹, Ginani VC¹, Barros DP¹, Ibanez ASS¹, Zecchin VG¹, Ribeiro LA¹, Gouveia RV¹, Seber A¹

¹Instituto de Oncologia Pediátrica - GRAACC - Unifesp

A infusão de células-tronco hematopoéticas provenientes da medula óssea é realizada após o degelo sem nenhuma manipulação para evitar possíveis perdas celulares. Entretanto, para alguns pacientes, a infusão do dimetilsulfóxido (DMSO) pode levar a efeitos adversos graves. Por isso, em nossa instituição, realizamos há muitos anos a remoção do DMSO para crianças com peso < 25 kg, insuficiência renal ou cardíaca e para infusão autóloga com dose de DMSO >1g/kg. O objetivo deste trabalho foi comparar retrospectivamente a recuperação celular, viabilidade celular e pega de neutrófilos dos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea com ou sem a remoção do DMSO. **Materiais e Métodos:** A medula óssea foi coletada no centro cirúrgico com solução Plasma-Lyte e heparina 100U/ml, kit manual, Baxter ou Bioaccess. O buffy-coat foi criopreservado 1:1 com solução 10% DMSO, 8% albumina humana e 12% hidroxietilstarsh. O congelamento foi em freezer -80oC, seguido de transferência para tanque de nitrogênio. Para o transplante, as células foram descongeladas em banho maria 37°C. A remoção do DMSO foi realizada segundo protocolo de Rubinstein: após o degelo foi lentamente adicionada à bolsa, na proporção 1:1, solução dextrano-albumina 5% a 4°C sobre superfície gelada, homogeneizando. Uma alíquota foi retirada para controle de qualidade e as células foram transferidas para bolsa de transferência e centrifugadas a 400g 4°C por 20 min. O sobrenadante foi transferido para uma nova bolsa e o buffy coat ressuspenso na mesma solução de dextrano – albumina e encaminhado para infusão com equipo simples. O sobrenadante final foi centrifugado até restarem <0,1x10⁸CNT/kg. **Resultados:** Avaliamos 62 pacientes e 64 infusões realizadas entre maio/09 e junho/12. Dois pacientes receberam parte do produto sem e outra com remoção do DMSO por terem apresentado efeitos adversos graves. Para três pacientes foi realizada apenas a diluição com dextrano na proporção 1:1 para facilitar a infusão através do port-a-cath. A remoção foi indicada em 14 procedimentos: a mediana de idade destes pacientes foi de 9 anos (3-21), sendo 10 do sexo feminino. Os diagnósticos foram LH (3), LNH (3), LMA (3), tumores

sólidos (5). A recuperação das CNT após a lavagem foi de 72% (59%->100%) e viabilidade após o degelo de 87% (69%-96%). A pega de neutrófilos ocorreu após mediana de 20 dias (11-30). No grupo de pacientes que recebeu medula sem remoção (N=50) a mediana de idade foi de 14 anos (3-27), sendo 34 do sexo masculino; a recuperação celular foi de 83% (45%->100%), viabilidade celular 80% (54%-94%) e pega de neutrófilos após mediana de 18 dias (10-34). Não encontramos diferenças significantes entre os dois grupos. Os custos da remoção foram R\$ 2.078 [mediana; variação R\$1.157-R\$3.918 vs. R\$123 sem remoção (R\$49-R\$296)]. Nenhuma complicação grave foi associada à infusão de MO autóloga embora a infusão sem DMSO seja associada a menos efeitos adversos (hemoglobinúria, náuseas, vômitos e alterações pressóricas). O teste de esterilidade foi negativo após todas as infusões. **Conclusão:** A remoção do DMSO em medula óssea foi um procedimento seguro que não comprometeu a recuperação celular ou pega. O custo para a remoção do DMSO é alto e sua eficácia será avaliada prospectivamente em protocolo duplo cego.