

---

# TRANSPLANTES

## TRANSPLANTES: BIOLOGIA E IMUNOLOGIA

1171

**Mesenchymal stem cells cultured on nerve growth factor loaded polymeric nanofibres: adhesion and cytotoxicity evaluation**Quintiliano K<sup>1,2</sup>, Crestani T<sup>1,2</sup>, Silveira D<sup>1</sup>, Helfer VE<sup>1</sup>, Rosa A<sup>1,3</sup>, Jotz GP<sup>2,4</sup>, Pilger DA<sup>1</sup>, Pranke P<sup>1,3,5</sup><sup>1</sup> Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS<sup>2</sup> Programa de Pós Graduação em Neurociência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS<sup>4</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS<sup>5</sup> Instituto de Pesquisa com Células-tronco - IPCT, Porto Alegre, RS

The use of polymeric *scaffolds* composed of nanofibres produced by *electrospinning* (ES) can serve as templates in which the cells can adhere, proliferate and differentiate, contributing to the development of a new tissue. The cell growth in the *scaffolds* can be stimulated through the controlled release of bioactive molecules, such as neurotrophic factors, which thereby enhance tissue regeneration. The nerve growth factor (NGF) can be associated to tissue engineering models representing an attractive alternative to permit the regrowth of injured nerves. NGF can facilitate cell proliferation and neuronal differentiation by modulating axonal growth, which is why it has been associated with potentially therapeutic approaches. The aim of this work was to develop poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofibre matrices loaded with NGF and to evaluate the behavior of mesenchymal stem cells (MSCs) on these devices through adhesion and cytotoxicity assays. The MSCs were extracted from human deciduous teeth pulp (hDTP), called SHEDs (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth). The dental pulp was removed and the MSCs extracted according to standard protocol. The assays were performed with cells seeded between the 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> passages. To permit NGF incorporation, the *scaffolds* were produced by emulsion *electrospinning* technique. The following *scaffolds* were developed, characterized and evaluated: (1) NGF loaded aligned *scaffolds*, (2) NGF loaded random *scaffolds*, (3) aligned *scaffolds* without NGF and (4) random *scaffolds* without NGF. Cultured cells on plate wells were used as the control group. Nanofibre morphology and diameter were analysed by scanning electron microscopy and NGF loading efficiency by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Cell adhesion on the *scaffolds* was assessed by DAPI fluorescence (n=5) and scaffold cytotoxicity was measured through quantification of LDH enzyme (n=3). In all groups, nanofibres with homogeneous morphology without beads were observed. The average diameter was 543±128 nm, 585±109 nm, 537±73 nm and 610±174 nm in groups 1, 2, 3 and 4 respectively (P>0,05). The average loading efficiency was 2.68±0.83%. This low efficiency of factor incorporation corroborates with previous results from the literature. The adhesion test showed no significant difference for the tested *scaffolds* when compared to the control group. This indicates a satisfactory interaction between the cells and the *scaffolds*. The LDH quantification demonstrated that *scaffolds* are nontoxic for the cells which were evaluated for 21 days of culture. As is well known, growth factors are potent molecules, which even at low concentrations can improve cell behavior and stimulate differentiation. Nerve regeneration is modulated by many interactions between cells, extracellular matrix (ECM) and growth factors. Thus, the local presence of these molecules at

the nerve injury sites plays an important role in nerve reconstruction. This combination between NGF and nanofibres not only provides physical support but also express biological signals to modulate tissue regeneration. Therefore, using nanotechnology for the incorporation of NGF in the *scaffolds*, the association of these devices and MSCs is a promising strategy for nerve tissue engineering. **Financial Support:** CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS and Stem Cell Research Institute.

1172

**Mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow from multiple sclerosis patients reveals immunosuppressive properties**Oliveira GL<sup>1</sup>, Malmegrim CR<sup>1</sup>, Colombini AM<sup>1</sup>, Viana PB<sup>1</sup>, Covas DT<sup>1</sup>, Voltarelli JC<sup>2</sup>, Donadi EA<sup>2</sup><sup>1</sup> National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy - INCTC, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP<sup>2</sup> Department of Clinical Medicine, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP

**Introduction/objective:** Mesenchymal stromal cells (MSCs) have shown immunosuppressive and immunoregulatory functions. These properties of MSCs suggest their potential role in tolerance induction in autoimmune diseases. We evaluated the antiproliferative capacity of MSCs derived from multiple sclerosis patients, their ability to induce regulatory T cells and secrete *IL-10* and TGF- $\beta$  *in vitro*. **Material and Methods:** MSCs were derived from bone marrow aspirates from MS patients (N=10) and healthy controls (N=10) and isolated by plastic adherence. For the inhibition assays, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were labeled with CFSE and cocultivated (1: 2, 1: 5 and 1: 10 ratios) with patients'and controls'MSCs in the presence of PHA at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> for 5 days. For the immune-regulation assays, non-labeled PBMCs were cocultivated with patients'and controls'MSCs. After 5 days of coculture, T-cell proliferation was assessed by CFSE method and the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> was assessed by flow cytometry. *IL-10* and TGF- $\beta$  was measured in coculture supernatants by CBA flex kit. The results were analyzed by Mann-Whitney test. This study was approved by the local ethics committee. **Results:** We observed significant differences (P=0.002) in proliferation mean percentage when comparing PBMCs plus PHA (71.3 ±12.9%) with patients'MSCs plus PBMCs at 1: 2 (33.3 ±13.4%), 1: 5 (39.1 ±21.9%) and 1: 10 ratios (46.6 ±20.1%). There were no differences (P>0.05) in percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells recovered after 5 days of coculture with patients'MSCs compared to controls. *IL-10* and TGF- $\beta$  secretion were significantly decreased (P<0.05) in supernatants derived from cocultures with patients'MSC (*IL-10*: 53.8 ±49.4; TGF- $\beta$ : 59.4 ±24.6 pg/mL) compared to controls (*IL-10*: 109.9 ±64.6; TGF- $\beta$ : 226.6 ±153.2 pg/mL). **Conclusions:** Although the MSCs isolated from MS patients were able to suppress T-cell proliferation, they showed lower secretion of *IL-10* and TGF- $\beta$  cytokines. These data suggest that MSCs from MS patients have immunosuppressive capacity *in vitro*, however more studies should be conducted before their use in autologous clinical applications. **Financial Support:** FAPESP.

1173

### 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 MP<sup>1</sup>, Covas DT<sup>2</sup>, Perlingeiro R<sup>3</sup>, Malvezzi M<sup>1</sup>, Azambuja AP<sup>1</sup>, Schluga Y<sup>1</sup>, Novello E<sup>1</sup>, Silva N<sup>1</sup>, Rocha MT<sup>1</sup>, Martins E<sup>1</sup>, Pimentel J<sup>1</sup>, Pasquini R<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP

<sup>3</sup> University of Minnesota, Minnesota, MN, USA

**Introdução:** A Anemia de Fanconi 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 hematopoéticas (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 23 pacientes durante um ano pós TMO. **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 23 pacientes estudados, dois foram a óbito. Vinte e dois pacientes mostraram aumento dos linfócitos CD3+CD4+ em relação às 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 g 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 transplante, 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 hematopoético 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.

1174

### Estudo comparativo da viabilidade celular dos leucócitos e das células CD34+ em diferentes amostras

Pimentel J<sup>1</sup>, Bach S<sup>2</sup>, Malvezzi M<sup>1</sup>, Azambuja AP<sup>1</sup>, Rocha MT<sup>1</sup>, Martins E<sup>1</sup>, Novello E<sup>1</sup>, Schluga Y<sup>1</sup>, Beltrame MP<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Faculdades Tuiti, Curitiba, PR

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 4,72x10<sup>6</sup>/Kg, CTHP 7,10x10<sup>6</sup>/Kg e SCU 3,69x10<sup>5</sup>/Kg. Nossos Resultados são semelhantes aos achados da literatura, valores de referência (média) para "pega" = 1,2 10<sup>5</sup>/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.

1175

### Análise do polimorfismo da região promotora do gene *FOXP3* -2383C/T em relação à rejeição do aloenxerto em pacientes transplantados renais

Alves DC<sup>1</sup>, Crispim JC<sup>2</sup>, Nascimento WG<sup>2</sup>, Silva GE<sup>3</sup>, Costa RS<sup>3</sup>, Saber LT<sup>4</sup>, Donadi EA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP

<sup>2</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Rio Grande do Norte, RN

<sup>3</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP

<sup>4</sup> Unidade de Transplante Renal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP

O transplante renal é o tratamento de escolha para pacientes com falha renal em estágio final. Uma das complicações do transplante renal é a rejeição do aloenxerto, sendo a indução de tolerância é o principal objetivo no transplante de órgãos. Muitos pacientes conseguem boa tolerância ao enxerto sob tratamento com imunossupressores, enquanto outros desenvolvem episódios de rejeição, sugerindo a participação de diversos mecanismos imunológicos e genéticos no controle da rejeição. As células T reguladoras (Tregs) de fenótipo CD4+CD25+, suprimem ativamente a resposta imune contra antígenos próprios e aloantígenos, promovendo tolerância antígeno específico por supressão da ativação e expansão de células efetoras. O fator de transcrição *Foxp3*, (forkhead Box p 3) é expresso em altos níveis em 95,7% das células CD4+CD25<sup>high</sup>, sendo considerado um fator chave para controlar o desenvolvimento dessas células. O polimorfismo de moléculas regulatórias tem sido associado com a evolução clínica de pacientes transplantados renais. Neste trabalho pesquisamos a influência do polimorfismo *Foxp3* -2383C/T (rs3761549) da região promotora do *Foxp3* em pacientes transplantados renais apresentando rejeição aguda (n = 19), rejeição crônica (n = 45) e não rejeição (n = 42) e ainda controles saudáveis (n = 81), usando a técnica de PCR seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). Para análise estatística usamos o teste de Fisher através do software GraphPad Instat para calcular as probabilidades alélicas e genotípicas entre os diferentes grupos. Encontramos que a frequência do alelo *Foxp3* -2383T foi quase duas vezes maior nos grupos com rejeição aguda (f = 0.1052) e crônica (f = 0.1111) que nos grupos sem rejeição (f = 0.0595) e controle saudável (f = 0.0740). Também encontramos maior frequência dos genótipos *Foxp3* -2383CT e *Foxp3* -2383TT e menor frequência do genótipo *Foxp3* -2383CC nos grupos de pacientes com rejeição que nos grupos sem rejeição e controle. No entanto nenhuma das comparações alélicas e genotípicas foi estatisticamente significante em relação aos diferentes grupos de pacientes. Nestes grupos de pacientes transplantados renais e controles saudáveis estudados, não encontramos nenhuma relação significante com relação ao polimorfismo *Foxp3* -2383C/T.

1176

### Human mesenchymal stem cells cultivated on epidermal growth factor-loaded scaffolds: a basis for neuronal tissue engineering

Crestani T<sup>1,2</sup>, Quintiliano K<sup>1,2</sup>, Helfer VE<sup>1</sup>, Santos DS<sup>1</sup>, Jotz G<sup>2,3</sup>, Pilger DA<sup>1</sup>, Pranke P<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>4</sup> Instituto de Pesquisa com Células-tronco - IPCT, Porto Alegre, RS

A strategy to optimize tissue regeneration is the use of nanofiber matrices containing growth factors (GFs). This is to ensure correct distribution of stem cells, enhancing their proliferative and differentiation capacity at the injury site, thus preventing the cells from migrating to other locations. The bioavailability of these factors can be obtained by incorporation GFs into nanofibers by *electrospinning*. The aim of this work was to produce aligned nanofiber matrices with incorporated epidermal growth factor (EGF) and to evaluate the influence of these *scaffolds* when mesenchymal stem cells (MSCs) are cultivated and differentiated into neural precursors into the *scaffolds*. The polymer solution consisting of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) was produced at a concentration of 15% (w/w) using 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol with 0.2% of Span 80, forming the oil phase. An aqueous solution of PBS containing 0.1% of albumin and 1mg/mL of EGF was mixed with the oil phase to form the emulsion. Aligned *scaffolds* with emulsion, without EGF (PLGA, group 1) and with EGF (PLGA/EGF, group 2) were produced using a cylinder rotating at 2,500 rpm. The control group was the cells cultured on wells. The matrices were evaluated for morphology and fiber diameter by scanning electron microscopy (SEM). The MSCs were extracted from human deciduous teeth pulp, called SHEDs (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) and used in the experiments in the 5<sup>th</sup> passage. For neuronal differentiation cells were seeded in culture plates of 24 wells (control group) and on *scaffolds* and then treated with DMEM supplemented with 30µM of retinoic acid. After 14 days, the differentiation was evaluated by phase contrast microscopy and immunofluorescence using primary antibodies, nestin and GFAP. PLGA and PLGA/EGF *scaffolds* showed aligned fibers, homogeneous morphology and absence of beads, with an average diameter of 548±29nm and 329±87nm, respectively. By confocal microscopy, it is possible to observe that SHEDs adhere on *scaffolds* following the same orientation of aligned fibers in group 1 and 2. Concerning neuronal differentiation, samples cultivated on the control group showed cells with neural phenotype, labeling positively for nestin and GFAP markers. The differentiation on group 1 and 2 is still in progress. The small and more variable diameter of the PLGA/EGF (329±87nm) is interesting because it mimics the collagen fibers of the extracellular matrix, where the diameter varies from 50 to 500nm. Through observation of the SEM photographs, it is possible to observe that the *scaffolds* have a high alignment and porosity. It allows for a three-dimensional arrangement of the cells in the scaffold and permits cellular growth and differentiation. SHEDs are capable of differentiating into neural precursors on the plates and adhere on aligned PLGA/EGF. Despite the neuronal differentiation in *scaffolds* not being complete, it is speculated that SHEDs will also be able to differentiate under the matrices and increase the expression of nestin and GFAP, due to the stimulus provided by the *scaffolds*, especially in group 2. Therefore, SHEDs cultivated on aligned PLGA/EGF can be a possible option for tissue engineering to treat neurological diseases. **Financial Support:** CNPq, FAPERGS, Stem Cell Research Institute.

1177

### Functional recovery after traumatic spinal cord injury in *Wistar* rats with administration of human umbilical cord mesenchymal stromal cells

Rodrigues LP<sup>1</sup>, Secco M<sup>2</sup>, Braghirolli DI<sup>3</sup>, Nicola FD<sup>4</sup>, Steffens D<sup>5</sup>, Valentim L<sup>4</sup>, Witczak A<sup>4</sup>, Zanatta G<sup>4</sup>, Achaval M<sup>5</sup>, Zatz M<sup>2</sup>, Pranke P<sup>3,6</sup>, Netto CA<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>2</sup> Centro de Estudos do Genoma Humano - CEGH, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP, SP

<sup>3</sup> Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>5</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>6</sup> Instituto de Pesquisa com Células-tronco - IPCT, Porto Alegre, RS

Spinal cord injury affects mostly young and previously healthy subjects. It results in motor and sensory impairments, either temporary or permanent and leads to chronic disability. There is still no effective therapy for spinal cord injury (SCI). Cell transplantation is a promising strategy to treat this condition. Adult stem cells, such as human mesenchymal stromal cells (hMSCs) are a potential source for reducing injury and promoting recovery of damaged tissues, such as spinal cord. An evaluation was made of the efficacy of hMSCs from human umbilical cord vessels to promote functional recovery when transplanted in rats after induced contusion SCI. Female *Wistar* rats were submitted to spinal injury with a MASCIS impactor and divided into 4 groups: control, surgical control, SCI and a cell-treated lesion group. hMSCs of the human umbilical cord vessels were transplanted in three experiments: a) 1 h post surgery, into the injury site at a concentration of  $3 \times 10^5$  cells diluted in 10  $\mu$ L 0.9% NaCl (N=10 per group); b) into the cisterna magna, 24 hours after lesion at the same concentration diluted in 150  $\mu$ L 0.9% NaCl (N=6 per group) and c) into the cisterna magna, 9 days after lesion at the same concentration diluted in 150  $\mu$ L 0.9% NaCl (N=6 per group). The transplanted animals were immunosuppressed with cyclosporin-A (10 mg/kg per day). The Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale was used to evaluate motor behavior of the lower members. The BBB scale ranges from 0 points (total paralysis) to 21 (normal movement). The injury site was analyzed with the following immunofluorescent markers: human-specific anti-*NUMA*, to detect the human transplanted cells; anti-*NG2*, to label the oligodendrocytes; *synaptophysin* as a neuronal marker; and *GFAP*, to label the astrocytes. Transplanted cells survived in the injury area for 6 weeks after the procedure. The animals that received hMSCs one hour after injury at the end of the sixth week reached a score of 18.8 points. This result was significantly different from the control injured rats without treatment, which showed a mean score of 12.7 points ( $p < 0.05$ ). In the experiments with cells transplanted 24 hours and 9 days post injury, the treated rats did not exhibit significant motor recovery when compared with the non treated injured rats. The results demonstrate that: a) stem cell transplantation was effective for functional recovery of SCI only when performed on the lesion site 1 h after injury, as compared with cell administration in the cisterna magna 24 hours and 9 days after injury; b) the transplanted human cells migrated and survived in the injured area for 6 weeks post injury procedure when administered in the cisterna magna; c) the cells survived in the injury site when administered directly and d) the hMSCs did not differentiate into glial cells or neurons, suggesting that functional recovery was due to other factors promoting neuroprotection. Despite the absence of detection of the differentiation of the transplanted cells, it can be concluded that the

transplantation of hMSCs promotes functional recovery after the SCI lesion, as demonstrated through the improved locomotion of spinal cord injury rats, when performed 1 hour after injury directly at the injury site. **Financial Support:** CNPq, FAPERGS and Stem Cell Research Institute.

1178

### Development of biomaterial for use in skin regeneration through the use of stem cells and nanotechnology

Steffens D<sup>1,2</sup>, Lersch M<sup>1</sup>, Leonardi D<sup>1</sup>, Rosa A<sup>1,2</sup>, Crestani T<sup>1</sup>, Scher C<sup>1</sup>, Soster PR<sup>3</sup>, Morais MG<sup>4</sup>, Costa JA<sup>4</sup>, Pranke P<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>4</sup> Faculdade de Engenharia de Alimentos e Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>5</sup> Instituto de Pesquisa com Células-tronco - IPCT, Porto Alegre, RS

The association of stem cells (SCs) with biomaterials promises to be the protagonist for future regenerative medicine in the treatment of tissue and organ lesions. Aiming at the utilization of the *scaffolds* of poly-D,L-lactic acid (PDLLA) associated or not with *Spirulina* biomass (PDLLA/Sp) (patent applied for) in skin wounds, mesenchymal SCs (MSCs) from kidney of mice were seeded onto nanofibres produced by *electrospinning*. The antiinflammatory and antimicrobial effects of the microalga *Spirulina* are interesting for skin application. The biodegradable and biocompatible matrices produced were evaluated for morphology, fibre diameter and pore size by scanning electron microscopy. Biological tests were performed as follows: (1) cell adhesion after 6 h of incubation using DAPI staining, (2) cell viability after 1, 4, 7 and 14 days cultivation by MTT assay and (3) cytotoxicity assay on days 4, 7 and 14, through the dosage of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH). The molds for growing MSCs were implanted in mice with skin defects that mimic burns. Three groups were tested: (1) PDLLA and PDLLA/Sp *scaffolds* with MSCs; (2) the same *scaffolds* without MSCs; and (3) animals injured without *scaffolds*. For groups 1 and 2, a protective cover of 100 nm thick PDLLA *scaffolds* was used. The MSCs were characterized by immunophenotyping profile using flow cytometry and differentiated into chondroblasts, osteoblasts and adipocytes. The fibre diameter and pore size of the *scaffolds* obtained for PDLLA were  $276 \pm 65.9$  nm and  $2,569 \pm 1,279$   $\mu$ m and for PDLLA/Sp  $263 \pm 82$  nm and  $2,395 \pm 1,047$   $\mu$ m, respectively. The adhesion assay showed that the cells adhere more on PDLLA/Sp *scaffolds* than only PDLLA. There is a statistical difference between these two groups but both are similar to the control group (cells cultivated directly on the well). In relation to the viability assay, in three points of measurement (days 1, 4 and 14) there was no statistical difference between the groups. On day 7 the number of live cells on the PDLLA *scaffolds* was statistically lower than the control group. No statistical difference was observed in the number of viable cells on the PDLLA/Sp compared with the control and PDLLA groups. Both *scaffolds* were atoxic for the SCs, presenting a dosage of LDH much lower than the Triton group, which represents the maximum toxicity. In respect to the animal experiments, the *scaffolds* implanted in animals tolerated the mechanical stress up to two weeks without breaking. In group 3, the wound seemed to be more disorganized and with a larger bloody area when compared to the other groups. The preliminary results from immunohistochemistry analysis showed that in group 1, the SCs were spread on all the surface of the molds, but not tridimensionally. In group 2, the SCs were observed only on the

borders of the *scaffolds*, suggesting the migration of the host cells. The *scaffolds* developed in this study demonstrated fibrous and porous structure similar to the natural extracellular matrix of the cells and, therefore, promise to be a new biomaterial suitable for use in TE, due to its suitable characteristics for the culture of cells. The association of nanotechnology and stem cell culture is an innovative approach for producing a cutaneous substitute for burn patients. **Financial Support:** CNPq, FAPERGS and Stem Cell Research Institute.

1179

### Biological properties of mesenchymal stem cell when associated with electrospun scaffolds with different diameters for use in tissue repair

Zamboni F<sup>1</sup>, Braghirolli DI<sup>1,2</sup>, Fin MC<sup>1</sup>, Pilger DA<sup>1</sup>, Pranke P<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS

<sup>3</sup> Instituto de Pesquisa com Células-tronco - IPCT, Porto Alegre, RS

The *electrospinning* (ES) technique has the advantage of forming *scaffolds* with fibres in a nanometric scale, imitating the collagenous fibres from the extracellular matrix in structure and dimension. These *scaffolds* present a higher superficial area and interconnected pores, exhibiting a favourable feature for the transport of nutrients and oxygen between cells and a favourable feature in cellular adhesion; thus, electrospun *scaffolds* can be widely used to promote cell growth. All their inherent characteristics listed above contribute to their upcoming application in tissue repair. The ES process can be modulated by several variables, resulting in different morphologies and fibre diameter. In this study, electrospun biocompatible and biodegradable composite *scaffolds* were prepared using three different poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) concentrations, 8%, 12% and 20% (w/v). The diameter and formation of beads was examined and the potential of stem cells for adhesion and proliferation on the *scaffolds* was also evaluated. The experimental set-up to conduct the ES procedure included a high voltage of 12kV, a collector to needle distance of 15cm, a constant flow rate of 0.16 mL/h and a 1mL syringe fitted with an 18 gauge needle. The scaffold morphology was analyzed by Scanning Electron Microscope and the fibre diameter was determined using ImageJ software. The images demonstrated that 8%, 12% and 20% of the PLGA solutions produced different types of nanofibres. 8% PLGA *scaffolds* had a large amount of beads along the fibres and a large number of thin broken fibres were also observed. As concentration and viscosity of PLGA solutions increased, the density of the beads declined. *Scaffolds* produced from 20% PLGA solution did not show beads. The diameter of the fibres increased along the polymer concentrations, with an average diameter of 42±11nm for 8% PLGA solution, 547±205nm for 12% PLGA solution and 1014±178nm for 20% PLGA solution. After their production, the *scaffolds* were sterilized with antimicrobial solution (1% of penicillin-streptomycin and 1% of fungizone in PBS 1X) for 2 hours, after which the cell studies were carried out. Human MSCs were isolated from deciduous dental pulp and cultured in DMEN media, supplemented with 10% fetal bovine serum: 1% antibiotic, in a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> and a temperature of 37°C. MSC cultures between the 6<sup>th</sup> until the 10<sup>th</sup> passage were seeded onto the *scaffolds* and analysed in terms of adhesion and proliferation rates (n=3). To evaluate adhesion, cells were stained with DAPI, photographed and counted. All the groups of *scaffolds* were good substrates to sustain cellular adhesion. The number of adhered cells on each type of scaffold after 6h of culture was similar between the three groups (p>0.05). MSCs were also able to proliferate on all the *scaffolds*. The MTT

assay displayed a significant absorbance increase (p<0.05) from 1 day to 15 days of culture in all the samples. The results demonstrate that the three fibre diameters and morphologies obtained by different PLGA concentrations are appropriate for cell culture, supporting the idea that ES is a versatile technique to produce nanofibre *scaffolds* and has great potential for future application in tissue engineering. **Financial Support:** CNPq, Capes, Fapergs and Stem Cell Research Institute.

1180

### Impacto clínico da recuperação linfocitária precoce na reconstituição imunológica pós transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas

Rigoni LD, Daudt LE, Ottoni E, Araújo BS, Scrofernecker ML, Paz A, Silla LM, Fischer G

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS

**Introdução:** O transplante de células tronco hematopoiéticas é capaz de curar as doenças hematológicas. O papel da repopulação linfocitária precoce no período pós transplante visa combater as células neoplásicas que resistiram ao regime de condicionamento e prevenir as infecções oportunistas graves. Sendo assim, uma contagem elevada de linfócitos no período pós transplante é capaz de reduzir a mortalidade relacionada ao transplante (TRM), melhorar a sobrevida livre de doença e reduzir a taxa de recidiva. **Objetivos:** Avaliar a recuperação linfocitária precoce no D+21 e D+30 pós transplante correlacionado com a taxa de recidiva da doença de base, mortalidade, sobrevida global e livre de doença. Analisar a frequência das complicações infecciosas neste período. **Métodos:** Analisado o número absoluto de linfócitos no D+21 e D+30 pós transplante de células tronco hematopoiéticas. Conforme dados da literatura definiu-se no D+21 e no D+30 aqueles com número absoluto de linfócitos abaixo e acima de 300 e se correlacionou os dados obtidos com a taxa de óbito, taxa de recidiva, sobrevida global em 5 anos, sobrevida livre de doença, em 5 anos, TRM em 100 dias, e mortalidade não relacionada a recaída (NRM). **Resultados:** Neste estudo foram incluídos 100 pacientes portadores das seguintes neoplasias hematológicas: leucemia mielóide aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias secundárias e síndrome mielodisplásica. Destes, 55 pacientes eram do sexo masculino e 45 do sexo feminino. A média de idade foi de 27,9 anos (mínima 9 meses e máxima 55 anos). A mediana do tempo de seguimento foi de 601 dias (IC 95% 106-1845). A mediana de CD 34 infundidos foi de 4,0 (IC 95% 2,4-5,7) e quanto a origem destas células CD 34 infundidas 85% foram de medula óssea (MO), 12% periférica (PBSC) e 3% sangue de cordão umbilical (SCU). Quanto ao tipo de condicionamento realizado 22% foram não mieloablativos e 78% mieloablativos. A mediana de linfócitos no D+21 foi de 460 (IC 95% 0 - 6250) e no D+30 foi de 760 (IC 95% 40-6370). Com relação a taxa de infecções observou-se que 19% das infecções foram de etiologia viral, 65% bacteriana e 17% fúngicas. A sobrevida global (OS) em 5 anos foi de 44 %, sobrevida livre de doença (DFS) foi de 37,7%, a mortalidade relacionada ao transplante (TRM) em 100 dias foi de 32,5%. E a mortalidade não relacionada a recidiva (NRM) em 5 anos foi de 40,2%. No desfecho óbito observamos que 69% dos pacientes que foram a óbito no D+21 tinham linfócitos abaixo de 300, e 43,9% tinham linfócitos acima de 300 (p<0,05). Pacientes com valores menores que 300 no dia 30 tem 2,20 vezes o risco de irem a óbito quando comparados com aqueles com valores acima de 300 (IC 95% 1,03-4,69) ajustado para DECH e CD34. Pacientes com valores menores que 300 no dia 30 tem 3,76 vezes o risco de irem a óbito em menos de 100 dias quando comparados com aqueles com valores acima de 300 (IC 95% 1,23-11,46) **Conclusões:** A reconstituição linfocitária precoce (> 300) no D+21 e no D+30 melhora a sobrevida global e livre de doença, bem como reduz a taxa de recidiva da doença de

base e reduz a mortalidade. **Palavras-chave:** número absoluto de linfócitos, transplante de células tronco hematopoiéticas, recuperação linfocitária.

## 1181

### Validação do sistema ACCURI C6? Para a quantificação de células tronco e progenitora hematopoiéticas CD34+

Lira CC<sup>1</sup>, Dias J<sup>1</sup>, Cascabulho C<sup>2</sup>, Thiago L<sup>2</sup>, Lima LG<sup>2</sup>, Nery P<sup>1</sup>, Bouzas LF<sup>1</sup>, Paraguassú-Braga FH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Banco de Sangue de Cordão Umbilical, CEMO, Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup> Laboratório de Imunologia, CEMO, Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** No decorrer dos anos vêm ocorrendo progressos clínicos relacionados ao transplante de células tronco e progenitoras hematopoiéticas (CTPH), baseados em avanços técnicos e científicos. E no curso desses progressos clínicos, a quantificação precisa de CTPH CD34<sup>+</sup> tem sido mandatória. A literatura relata que o número de células CD34<sup>+</sup> infundida é considerado um fator prognóstico importante relacionado à "pega" do enxerto. Assim, o avanço e o uso da citometria de fluxo tem se tornado indispensável na prática clínica e laboratorial para a identificação e quantificação dessas células. **Objetivo:** Validar o sistema Accuri C6<sup>®</sup> (BD Accuri cytometers) para a quantificação de CTH CD34<sup>+</sup> por comparação interlaboratorial de Resultados obtidos através do sistema FacsCan (BD, San Jose, Califórnia), com estratégia de aquisição e análise previamente validadas. **Métodos:** Foram avaliadas 65 amostras de três diferentes fontes de CTPH, MO (n=6), SPM (n=16) e SCUP (n=43). Após análise e quantificação de células CTPH CD34<sup>+</sup> 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<sup>®</sup>. A quantificação das CTPH CD34<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (r<sup>2</sup>=0,93) como no número de células CD34<sup>+</sup> totais (r<sup>2</sup>=0,97) quando comparado Accuri C6<sup>®</sup> versus Facscan. As medianas apresentadas foram de 146,9 céls/mm<sup>3</sup> (variação de 37,8 – 1906,4 céls/mm<sup>3</sup>) e 3,9x10<sup>6</sup> células CD34<sup>+</sup> totais (variação de 0,8 – 179,7x10<sup>6</sup>) para o sistema Accuri C6<sup>®</sup>. Para o FacsCan, as medianas foram de 153,7 céls/mm<sup>3</sup> (variação de 26,3 – 2092,2 céls/mm<sup>3</sup>) e 3,7x10<sup>6</sup> células CD34<sup>+</sup> totais (variação de 0,5 – 183,7x10<sup>6</sup>). Entretanto, a análise por regressão linear mostrou uma menor correlação no percentual da população CD34<sup>+</sup> (r<sup>2</sup>=0,74), quando comparado os sistemas Accuri C6<sup>®</sup> versus FacsCan, apresentando medianas de 0,1% (variação de 0,02 – 1,09%) e 0,3% (variação de 0,05 – 2,53%), respectivamente, o que se deve a particularidades do *software* de análise utilizado para cada sistema. **Conclusão:** Esses Resultados sugerem que o sistema Accuri C6<sup>®</sup> segue critérios importantes para a rotina clínica e laboratorial de quantificação de CTH CD34<sup>+</sup>, 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.

## 1182

### Viabilidade celular por citometria de fluxo em células criopreservadas para transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas

Silva AM<sup>1</sup>, Wagner-Souza K<sup>1</sup>, Porto-Gusmão N<sup>1</sup>, Silva GA<sup>1</sup>, Arcindo WR<sup>1</sup>, Rossi MI<sup>2</sup>, Borojevic R<sup>2</sup>, Maiolino A<sup>1</sup>, Dutra HS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biomédicas – CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** A qualidade de células progenitoras hematopoiéticas (CPH) mobilizadas para transplante é frequentemente avaliada pela viabilidade celular por exclusão com azul de Trypan por microscopia óptica (MO). Este método é limitado pela baixa quantidade de células analisadas e variabilidade entre observadores. O uso da citometria de fluxo com a 7-amino-actinomicina D (7AAD) reduz estas limitações e proporciona análise direta da viabilidade nas CPH. Entretanto, ainda não existe consenso metodológico para este ensaio. Para estabelecer o teste de viabilidade celular por citometria em produtos criopreservados em nossa Instituição, comparamos dois protocolos de preparo das células para análise e determinamos as diferenças na taxa de viabilidade da população global (CD45<sup>+</sup>), linfocitóide (CD45<sup>+</sup>/SSC<sup>low</sup>) e das CPH (CD45<sup>low</sup>/CD34<sup>+</sup>) entre os Métodos. **Métodos:** Analisamos 21 produtos de leucáfeses de 17 pacientes. O tempo de criopreservação em nitrogênio líquido foi de até 60 semanas. A análise de viabilidade das células descongeladas marcadas com 7AAD foi feita após lise das hemácias com cloreto de amônio seguida ou não de lavagem com solução de dextran/albumina (LL-Lise com Lavagem; LSL-Lise sem Lavagem). As análises de citometria foram realizadas por quatro operadores; Resultados da análise de produtos descongelados foram comparados com os dados da citometria obtida antes do congelamento. A capacidade proliferativa das CPH foi medida pela quantificação em gel de agar semi-sólido e os Resultados foram comparados com os de viabilidade celular nas CPH. Para as análises estatísticas foram realizados teste pareado de Wilcoxon para comparação de duplas e teste de Spearman para correlação. **Resultados:** A taxa de células linfocitóides e CPH foram semelhantes nos dois Métodos. Entretanto, a taxa de células viáveis na população global, linfocitóide e das CPH foi maior no método LL. A influência do tempo de exposição ao cloreto de amônio foi um fator importante para a redução da viabilidade celular no método LSL, a taxa de viabilidade sofreu alteração após 60 min (p = 0,0286). A perda de viabilidade não apresentou correlação com a perda de capacidade proliferativa das CPH (LL- r=-0,1000 e p = 0,6663; LSL- r=-0,2174 e p = 0,2340). A taxa média de viabilidade global por citometria foi menor que a obtida por microscopia óptica - LL- 68,9%; LSL- 62,80% e MO- 82,30% (MO x LL ou MO x LSL- p < 0,005). A taxa de CPH após o congelamento apresenta correlação significativa com a obtida antes do congelamento (LL- r= 0,6760 e p = 0,0008; LSL- r= 0,7770 e p < 0,0001), mas nos dois Métodos analisados esta taxa foi maior após o congelamento (mediana da taxa de aumento: LL- 88%; LSL- 102%). Este aumento não foi observado na taxa de células linfocitóides. **Conclusão:** A taxa de viabilidade pode sofrer alteração de acordo com a metodologia utilizada para marcação com 7AAD de amostras descongeladas. Além disso, o tempo entre a marcação das células e a análise pode influenciar na viabilidade se as células forem mantidas em cloreto de amônio. Usando os Métodos descritos neste trabalho, a quantificação de CPH após a criopresevação pode ser superestimada quando comparada com a taxa encontrada antes deste procedimento. Um estudo comparado destes Métodos com a citometria de fluxo em plataforma única deve ser implementado para esclarecer os dados obtidos.

1183

### Isolamento e expansão de células multipotentes mesenquimais para fins clínicos: associação do sistema de processamento Sepax com sistema de cultivo Petaka

Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF

Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, CEMO, Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** As Células Multipotentes Mesenquimais (CMM) têm ganhado importância estratégica na medicina regenerativa, com potencial para tratamento de lesões, doenças degenerativas, e recuperação de massa tecidual perdida por qualquer agravo. Uma fonte bastante útil das CMM é a medula óssea (MO) hematopoiética, de onde a propriedade de adesão ao plástico é capaz de promover o isolamento e expansão. Os protocolos correntes, contudo, utilizam isolamento, cultivo e expansão em sistemas abertos convencionais, com menor rigor e segurança para o enxerto que tem potencial para terapia celular. O sistema SEPAX é capaz de realizar separação em gradiente de densidade em sistema fechado, e o sistema de cultivo PETAKA é capaz de cultivar células em sistema fechado, em regime de alta densidade e independente de CO<sub>2</sub>. A associação dos dois parece uma combinação lógica e adequada para fins terapêuticos. **Objetivo:** Quantificar a produção de CMM a partir da associação dos sistemas SEPAX e PETAKA. **Métodos:** Foram coletados 100mL aproximadamente de MO da crista ilíaca de doadora voluntária com devido consentimento livre e esclarecido de um protocolo emergencial para radioqueimadura. Essa amostra foi processada por sistema SEPAX (protocolo separação por gradiente de densidade), sendo obtidos 179 milhões de células nucleadas totais (CNT) como lote 1. Ao resto do processamento foi submetido a concentração também pelo sistema SEPAX (protocolo redução de Volume), obtendo-se, 100mL. Esse foi novamente processado por gradiente de densidade, obtendo-se 78 milhões de CNT como lote 2. Ambos os lotes foram cultivados a uma densidade de 2x10<sup>5</sup> céls/mL em meio CMM.INCA. Amostras dos 2 isolados foram testadas para CFU-F e comparadas com amostras pré-processamento. Ainda, as culturas foram acompanhadas por microscopia, quantificando-se o número de células por campo fixo ou corrigido, permitindo o estabelecimento de curva de proliferação até o repique. Foram avaliadas ainda a possibilidade de contaminação microbiológica por semadura em frascos de hemocultura, cultivo e análise. **Resultados:** O processamento no sistema SEPAX resultou em um enriquecimento de cerca de 1,4 x para o lote 1 e 2,1 x para o lote 2 em relação ao controle pré-processamento. Semeadas no sistema PETAKA de cultivo celular, a população do lote 1 apresentou um Doubling Time (DT) de 2,3 dias enquanto o lote 2 apresentou DT de 1,3 dias. Em média, cada placa de cultivo foi capaz de fornecer 1,0x10<sup>6</sup> células quando 75-85% de confluência, ao final de 2 semanas de cultivo. Não foram detectadas contaminações de aeróbios, anaeróbios e fungos. **Conclusão:** O binômio SEPAX-PETAKA cumpriu com o objetivo de isolamento, cultivo e expansão de CMM, com forte inclinação para uso terapêutico.

1184

### Expressão dos genes FOXP3 e RORGT como possíveis biomarcadores para a doença do enxerto versus hospedeiro aguda

Cabral CM<sup>1,2</sup>, Braga WM<sup>1</sup>, Oliveira JS<sup>1,2</sup>, Colleoni GW<sup>1</sup>, Kerbauy FR<sup>1</sup><sup>1</sup> Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP<sup>2</sup> Hospital Santa Marcelina, São Paulo, SP

**Introdução:** O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico é uma modalidade terapêutica consagrada para o tratamento de diversas doenças hematológicas. Apesar de todos os avanços relacionados ao TCTH, a doença do enxerto *versus* hospedeiro aguda (DECHA) continua a ser a mais frequente complicação, repercutindo diretamente na morbimortalidade relacionada ao transplante. Os linfócitos T reguladores (T<sub>reg</sub>) desempenham papel fundamental na manutenção da auto-tolerância imunológica e sua recuperação adequada em número e função, após o TCTH, seria fator fundamental para o efetivo controle de linfócitos T citotóxicos e ausência de DECH. Mais recentemente, as células Th<sub>17</sub> parecem contribuir para o desenvolvimento da DECH através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de linfócitos Th1 em órgãos linfóides na fase inicial após o TCTH. Nesse contexto, a manipulação destas subpopulações pode ser um alvo terapêutico para o controle da DECH. **Objetivo:** Caracterizar as subpopulações de linfócitos T<sub>reg</sub> e TH<sub>17</sub> em sangue periférico de pacientes submetidos à TCTH e correlacioná-las com desenvolvimento de DECHA. **Métodos:** Para este estudo piloto, foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes pré e pós TCTH, e no momento da DECHA nos serviços da UNIFESP e HSM. A expressão dos genes *FOXP3* e *ROR g t*, como principais representantes das subpopulações de linfócitos T<sub>reg</sub> e TH<sub>17</sub>, respectivamente, foi avaliada através do Real Time-PCR quantitativo (qPCR) utilizando-se o equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (*Applied Biosystems*), pelo método Taqman. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando o valor de *fold* foi 2 vezes maior ou menor nos casos em relação dos controles normais. **Resultados:** Foram analisados oito pacientes submetidos à TCTH alogênico, seis com diagnóstico de leucemia aguda e dois com síndrome mielodisplásica, com mediana de idade de 47anos (21-51), sendo 50% mulheres. Todos os pacientes foram submetidos à TCTH mieloablativos com doador HLA idêntico aparentado. Seis (75%) destes pacientes apresentaram DECHA com média de aparecimento de 31,8 dias (18-46) pós TCTH, sendo 67% com estadiamento clínico Grau I/II, segundo os critérios de Glucksberg-Seattle. Em 67% dos pacientes que apresentaram DECHA houve redução da expressão do gene *FOXP3* no momento do aparecimento desta e, em 50% desses pacientes houve aumento da expressão do gene *ROR g t*. Nos dois pacientes que não apresentaram DECHA, o nível de expressão do gene *FOXP3* encontrava-se elevado durante o período pós TCTH. **Conclusão:** Nesse pequeno grupo de pacientes, observamos que na presença de DECHA, os níveis de *FOXP3* se mantêm baixos e *ROR g t* elevados. Esses dados preliminares sugerem que o desbalanço entre as subpopulações de linfócitos T<sub>reg</sub> e TH<sub>17</sub> podem desempenhar um papel importante e talvez, um alvo interessante de terapia celular para a DECHA.

1185

### Duplo transplante em portadores de mieloma múltiplo - criopreservação por longo prazo e pega do enxerto

Silva GA<sup>1</sup>, Silva AM<sup>1</sup>, Labeta-Costa F<sup>1</sup>, Silva MP<sup>1</sup>, Pereira BR<sup>1</sup>, Borjevic R<sup>2</sup>, Maiolino A<sup>1</sup>, Dutra HS<sup>2</sup><sup>1</sup> Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biomédicas – CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** A quimioterapia em altas doses em associação com o transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas (TACTH) é, na atualidade, uma das mais importantes terapias de suporte a pacientes com doenças oncohematológicas. Em doenças como o Mieloma Múltiplo (MM), onde a frequência de recidiva é alta, os pacientes podem ser submetidos a múltiplos transplantes. Nesses casos as células tronco hematopoiéticas (CTH) são colhidas e criopreser-



vadas previamente ao primeiro transplante e permanecem estocadas pelo tempo necessário, conforme evolução da doença, até o segundo transplante. A criopreservação por longo prazo ainda é restrita e requer estudos que explorem suas limitações. **Objetivos:** Nosso objetivo foi analisar a influência do tempo de armazenamento das CTH, do primeiro para o segundo transplante, na pega do enxerto, considerando: a quantidade de células CD34<sup>+</sup>, a viabilidade, a capacidade proliferativa *in vitro*. **Métodos:** Este estudo abrange 23 transplantes de células progenitoras hematopoéticas para pacientes portadores de MM, cuja ocorrência do segundo transplante (T2) se deu num prazo maior que um ano após a criopreservação das células. O primeiro transplante (T1) de cada paciente serviu como controle para os parâmetros analisados. O tempo médio entre o T1 e o T2 foi de 36 meses (16-78 meses). Os produtos de leucáfeses das CTH foram criopreservados com plasma autólogo, meio RPMI 1640 e 10% de DMSO e estocados em nitrogênio líquido. As CTH foram quantificadas por citometria de fluxo, usando metodologia recomendada pela ISHAGE, e por ensaio clonogênico em ágar semi-sólido com meio condicionado da linhagem 5637, como fonte de fatores de crescimento para quantificar Unidades Formadoras de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (UFC-GM). A viabilidade celular foi definida por microscopia ótica com o método de exclusão por Azul de Trypan. As análises de significância foram feitas com os testes T não paramétricos, pareado (Wilcoxon) e não pareado (Mann-Whitney). Foram considerados significativos os Resultados com  $p < 0,05$ . **Resultados:** Não encontramos diferenças significativas entre os produtos utilizados no T1 e T2 quanto à quantidade de células CD34<sup>+</sup> infundidas (medianas de 4,26 - T1 e 4,11 x10<sup>6</sup>/kg - T2), a quantidade de UFC-GM (medianas de 21,8 - T1 e 15,1 x10<sup>4</sup>/kg - T2). O teste criobiológico realizado no descongelamento dos produtos utilizados teve a recuperação da viabilidade de 85,1 % (65,7-95,1%) e recuperação da capacidade proliferativa de 54,7% (2,8-165,9). O tempo para pega do enxerto não diferiu entre os transplantes – mediana de 11 dias (9 a 13 dias - T1; 10 a 13 - T2). Entretanto, os pacientes que tiveram o T2 (7/23) com um prazo de armazenamento maior que 48 meses, tiveram a mediana de pega do enxerto em 9 dias no T1 e em 11 dias em T2 ( $p=0,0126$ ). **Conclusão:** Produtos que foram armazenados em nitrogênio líquido para transplante no prazo de 16 a 78 meses tiveram pega do enxerto em prazo equivalente aos transplantes realizados após a criopreservação de curto prazo. Este estudo teve limitação em sua casuística, mas ressalta a importância de análises em subgrupos de pacientes que sejam transplantados com células que sofrem armazenamento de longo prazo, levando em consideração as variáveis impostas sobre o produto e a evolução clínica no intervalo de dois transplantes.

## 1186

### Valor prognóstico das subpopulações de linfócitos T e da razão linfócito/monócito em pacientes com linfoma de Hodgkin submetidos ao transplante autólogo de células progenitoras hematopoéticas

Correa LE<sup>1</sup>, Garcia MC<sup>2</sup>, Melo MF<sup>2</sup>, Borojevic R<sup>2</sup>, Maiolino A<sup>1</sup>, Dutra HS<sup>2</sup>, Schaffel R<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Hematologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ,

**Introdução:** A quimioterapia de altas doses com transplante autólogo de células progenitoras hematopoéticas (TACPH) é o tratamento de escolha para pacientes que apresentam linfoma de hodgkin (LH) recidivado ou refratário. Durante o Hemo 2010, demonstramos de forma preliminar que os linfócitos infundidos junto às células-tronco têm valor prognóstico em pacientes com linfomas agressivos. Agora, selecionamos uma amostra homogênea de pacientes com LH

submetidos ao TACPH e analisamos o impacto prognóstico da dose de linfócitos T do enxerto bem como de 4 subpopulações linfocitárias, da relação linfócito/monócito pré-TACPH e o valor da relação linfócito/monócito, recém descrita em LH. **Pacientes e Métodos.** 25 pacientes com LH em recidiva ou refratários foram submetidos ao TACPH entre maio de 2007 e outubro de 2010. Todos tiveram sobrevivência mínima de 30 dias após a infusão do enxerto e informações adequadas para o cálculo da sobrevivência livre de recaída (SLR) e da sobrevivência global (SG). As populações linfocitárias do enxerto foram determinadas por citometria de fluxo. Estas foram: linfócitos T (CD3+), linfócitos T helper (CD3+CD4+CD8-), linfócitos T citotóxicos (CD3+CD4-CD8+), linfócitos T duplo-positivos (CD3+CD4+CD8+) e linfócitos T duplo-negativos (CD3+CD4-CD8-). A relação linfócito/monócito foi calculada a partir do hemograma coletado antes do início do TACPH. A mediana das variáveis foi utilizado para a divisão da amostra em dois grupos e determinação do impacto na SLR e SG. As curvas de sobrevivência foram determinadas pelo método de Kaplan Meyer e a diferença entre elas estimada pelo teste de Log Rank. A análise multivariada foi realizada pelo método de Cox. **Resultados:** A amostra foi composta de 13 homens e 12 mulheres. A idade mediana foi de 26 anos. Todos os casos de LH foram do subtipo esclerose nodular sendo grau II em 3. O estadiamento foi obtido em 22 casos: I ou II em 7 e III ou IV em 15 casos. Houve sintomas B em 65% dos casos. O esquema de mobilização foi filgrastima 10 microgramas/kg em 21 casos. A contagem mediana de células do enxerto foi: CD34+ 2,99 x 10<sup>6</sup>/kg, linfócitos T 215 x 10<sup>6</sup>/kg, T-helper 105 x 10<sup>6</sup>/kg, T-citotóxico 79 x 10<sup>6</sup>/kg, duplo-positivos 1,3 x 10<sup>6</sup>/kg e duplo-negativos 12 x 10<sup>6</sup>/kg. Em 12 pacientes, todas as subpopulações linfocitárias analisadas apresentaram-se abaixo do valor mediano ou todas acima do valor mediano da amostra. Em um tempo mediano de seguimento de 2,8 anos houve 8 recaídas e 6 óbitos. Na análise de SLR, os fatores prognósticos foram a dose de linfócitos T ( $P=0,05$ ), linfócitos T-citotóxicos ( $P=0,08$ ), linfócitos duplo-negativos ( $P=0,04$ ) e razão linfócito/monócito ( $P=0,02$ ). Já para a SG, eles foram os linfócitos T ( $P=0,06$ ) e linfócitos duplo negativos ( $P<0,01$ ). Na análise multivariada da SLR, a dose de linfócitos duplo negativos foi a única variável com significância estatística. **Conclusões:** A dose de linfócitos T tem importância prognóstica no TACPH em pacientes com LH. Dentre as subpopulações de linfócitos T analisadas, as células CD3+CD4-CD8- foram aquelas que melhor discriminaram grupos de bom e mau prognóstico. Estas células foram pouco estudadas até o momento. A razão linfócito/monócito associou-se com SLR na análise univariada. Estudos com um maior número de pacientes serão importantes para validar os nossos achados.

## 1187

### Avaliação da trealose intra e extracelular como potencial crioprotetor para as células do sangue de cordão umbilical e placentário

Motta JP<sup>1,2</sup>, Paraguassú-Braga FH<sup>2</sup>, Bouzas LF<sup>2</sup>, Pôrto LC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup> Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, CEMO, Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** O sangue do cordão umbilical (SCU) tem sido usado como fonte de células-tronco hematopoéticas primitivas e células progenitoras pluripotentes em aplicação clínica para reconstituir o sistema hematopoético e/ou para restaurar a função imunológica *in vivo*. A maioria das vezes, esta modalidade de transplante requer a criopreservação e armazenamento de células-tronco hematopoéticas (CTH). Na criopreservação de CTH, o reagente químico dimetilsulfóxido (DMSO) é amplamente utilizado como um crioprotetor, porém seu uso está relacionado a diversos efeitos colaterais nos pacientes que recebem produtos criopreservados com essa substância. Muitos organismos na natureza possuem uma capacidade de sobreviver o congelamento e a desidratação,

sintetizando e acumulando dissacarídeos, por causa disso dissacarídeo como a trealose, tem sido ativamente investigada como um crioprotetor alternativo. A trealose naturalmente só atua na crioproteção no meio extracelular, por não possuir a capacidade de entrar na célula. A utilização de lipossomas como veículo de entrega dessa substância na célula, é uma alternativa a essa questão. **Objetivo:** Este estudo avaliou a hipótese que a solução de criopreservação contendo trealose intracelular e extracelular melhora a recuperação e a viabilidade das CTH de SCU, após a criopreservação. **Métodos:** SCU foi processado e submetido à criopreservação em soluções contendo diferentes concentrações de DMSO (10% e 2,5%), assim como as combinações de DMSO (2,5%) com trealose intra (a trealose foi introduzida na célula por meio de lipossomas) e extracelular e soluções contendo trealose intra e extracelular sem DMSO, armazenados por duas semanas em N<sub>2</sub>L, e descongelados. As células descongeladas foram avaliadas por citometria de fluxo (7AAD e CD45+/CD34+), viabilidade pelo MTT e o potencial clonogênico das CTH foi avaliada pelo ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC). **Resultados:** Após as análises de todos os testes vimos que a solução que continha trealose intra e extracelular e DMSO obteve uma capacidade de manutenção da viabilidade/integridade celular superior a todas as outras testadas, a solução que continha trealose intra e extracelular sem DMSO obteve um resultado que se pode comparar com seu controle (2,5%DMSO), e a solução que continha apenas trealose intracelular não obteve Resultados satisfatórios. **Conclusão:** A trealose quando presente em ambos os lados das células durante o processo de congelamento, é um potencial crioprotetor das células-tronco de SCU comparável ao DMSO.

## 1188

### Isolamento de células multipotentes mesenquimais de medula óssea utilizando microcarreadores macroporosos

Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF

*Banco de Sangue de Cordão Umbilical, CEMO, Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, RJ*

**Introdução:** As Células Multipotentes Mesenquimais (CMM) têm ganhado importância estratégica na medicina regenerativa, com potencial para tratamento de lesões, doenças degenerativas, e recuperação de massa tecidual perdida por qualquer agravo. Uma fonte bastante útil das CMM é a medula óssea (MO) hematopoiética, de onde a propriedade de adesão ao plástico é capaz de promover o isolamento e expansão. Os protocolos correntes para fins de pesquisa utilizam a propriedade de adesão, sobre o plástico de frascos de cultura, para isolamento, cultivo e expansão. A utilização de frascos de cultura leva a utilização de grandes volumes por área de cultivo, que cresce progressivamente com a expansão da massa de células. Microcarreadores são resinas hidratáveis capazes de sustentar a adesão celular e sistemas de cultivo em agitação/suspensão. São utilizadas em bioreatores para diferentes níveis de produção biotecnológica. O cultivo em microcarreadores permite cultura de células em alta densidade. **Objetivo:** Avaliar a possibilidade do isolamento de CMM em microcarreadores macroporosos. **Métodos:** Duas amostras de Medula Óssea remanescentes do processamento doadores para transplante alógeno foram concentradas, quantificadas e misturadas com volume de microcarreadores previamente hidratadas com meio CMM. INCA e área correspondente a 550 cm<sup>2</sup>. A dose média inicial de células nas duas amostras foi de 5,5 x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>. As células foram incubadas em tubos de 50mL, inclinadas a 20° em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C sem qualquer manipulação. Ao longo do D7 e D16 de cultivo, as células foram cultivadas com reposição parcial do meio a cada semana e amostras de 600µL de cada amostra foram semeadas em 3 poços de placas de 6 poços para avaliação de formação

de colônias tipo CFU-F. **Resultados:** Amostras do D7 resultaram na formação de colônias tipo CFU-F (D7= 3,2±2,1 CFU-F/ PC e D16=10,7±1,2). A velocidade de expansão em termos de CFU-F foi de 0,6 CFU-F/dia. **Conclusão:** A utilização de microcarreadores macroporosos é uma alternativa viável para isolamento de CMM de medula óssea, em quantidade reduzida de meio de cultura e com boa velocidade de expansão.

## 1189

### Silenciamento de CD55 e CD59 para aumento da lise de linfócitos T CD20+ mediada por rituximab

Curzio BA, Oliveira AC, Bonamino MH

*Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, RJ*

**Introdução:** A doença enxerto contra o hospedeiro (DECH) é a principal complicação do transplante alógeno de precursores hematopoiéticos e é causada pelos mesmos linfócitos T que exercem o efeito do enxerto contra a leucemia. Para se eliminar estas células no caso de DECH, foram propostas estratégias baseadas em genes suicidas, como a expressão do antígeno CD20 nas células T e a eliminação das mesmas com o anticorpo monoclonal Rituximabe. A expressão de CD20 em linfócitos B permite antecipar uma eliminação indesejada destas células em caso de utilização de Rituximabe para a depleção das células T CD20+. As proteínas CD55, CD59 e CD46 são reguladoras da cascata do complemento. Nossa hipótese é que o silenciamento de CD55 e CD59 por shRNA em células T CD20+ pode resultar em aumento de morte celular por complemento na presença do Rituximabe. Esta abordagem permitiria o uso de doses subótimas de Rituximabe para a eliminação das células T CD20+, o que permitiria poupar ao menos uma fração das células B dos pacientes, evitando o principal efeito colateral deste novo sistema de gene suicida. **Objetivos:** Avaliar o impacto do silenciamento de CD55 ou CD59 na lise de células T CD20+ no sistema de gene suicida CD20/Rituximabe; avaliar a expressão de CD55, CD59 e CD46 nas células T e B de indivíduos saudáveis; descrever a cinética destas proteínas em células T; correlacionar o silenciamento de CD55 e CD59 em células Jurkat CD20+ com a lise na presença de doses sub-ótimas de Rituximabe. **Métodos:** A expressão de CD55 e CD59 foi verificada por citometria de fluxo nos linfócitos T e B de 25 doadores saudáveis e a expressão de CD46 nos linfócitos de 8 doadores saudáveis. Os linfócitos de 12 destes doadores foram incubados com concentrações sub-ótimas de Rituximabe e soro de coelho para verificarmos a possibilidade de poupar uma fração destes. Para testarmos o impacto do silenciamento de CD55 e CD59 na lise das células Jurkat previamente modificadas para expressarem o CD20, as seqüências de shRNAs para CD55 ou CD59 foram clonadas no plasmídeo PT3, que contém a sequência codificadora da GFP e ITRs que permitem a recombinação na presença da transposase SB100X, e o mesmo foi eletroporado em células Jurkat CD20+. As células CD20+GFP+ foram submetidas à lise em condições subótimas de soro e Rituximabe e foram avaliadas após a lise por citometria de fluxo. **Resultados e Discussão:** A expressão de CD55 é significativamente maior em células B do que em células T e a expressão de CD59 e CD46 é significativamente maior em células T do que em células B. Após a ativação de células T, verificamos um aumento significativo da expressão de CD59 e CD46 nos dias 5 e 7. Submetemos as células B de 12 doadores à lise e observamos duas categorias de doadores contendo: células B mais suscetíveis ou menos suscetíveis à lise por Rituximabe *in vitro*. Além disso, estabelecemos uma condição de lise subótima (1,25 µg/ml de Rituximabe e 10% de soro) que poupa em média 40% dos linfócitos B. Nestas condições, as células T CD20+ interferidas para CD55 ou CD59 se tornaram mais suscetíveis à lise mediada por Rituximabe em comparação às células não interferidas. Portanto, o silenciamento

to de CD55 ou CD59 aumentou a eficácia do sistema de gene suicida CD20/Rituximabe. **Apoio financeiro:** Instituto do Milênio – Terapia Gênica, CNPq, FAPERJ, Ministério da Saúde – INCA, Fundação do Câncer

1190

### Low counts of dendritic cells after engraftment are associated with higher incidence of acute GVHD and worse survival in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Gonçalves MV<sup>1</sup>, Yamamoto M<sup>1</sup>, Colturato VA<sup>2</sup>, Hamerschlak N<sup>3</sup>, Seber A<sup>4</sup>, Ikoma MV<sup>2</sup>, Rocha V<sup>5</sup>, Orfao A<sup>6</sup>, Rodrigues CA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

<sup>2</sup> Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP

<sup>3</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

<sup>4</sup> Instituto de Oncologia Pediátrica – GRAACC, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

<sup>5</sup> Hospital Sírio-Libanês – HSL, São Paulo, SP

<sup>6</sup> Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

**Background:** The heterogeneous status of host immune defenses may influence the risk of infection and graft-versus-host disease (GVHD) after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). In such defense, dendritic cells (DC), which act as specialized antigen-presenting cells that bridge the innate and adaptive immune systems, are essential cell components. **Objectives:** To monitor the recovery of different subsets of DC after umbilical cord blood (UCB), bone marrow (BM), and peripheral blood (PBSC) HSCT and to evaluate the impact of the distribution of these cell subsets on the outcome of the transplant. **Methods:** DC [lineage negative, HLA-DR+ and CD123+ plasmacytoid(p) C, CD11c+ myeloid(m) C, and CD16+ monocytoïd(m) C] were quantified by multiparametric flow cytometry at 6 sequential time points (at engraftment, and at days 3, 7, 14, 21 and 60 after engraftment). Overall, 53 patients (34 male; median age 15y, range 1-74y) receiving a UCB (n=21), BM (n=22) or PBSC (n=10) HSCT from unrelated (n=48) or related donors (n=5) were studied. The most common diagnosis was acute leukemia (AML, 18 cases; ALL, 14; aplastic anemia/MDS, 11; other, 10). Most patients received myeloablative conditioning (MAC) regimens (n=38, 73%). Antithymocyte globulin (ATG) was used in 21 patients (40%) and total body irradiation (TBI) in 25 (47%). Median follow up time was 14 months. **Results:** Median time to neutrophil engraftment was 18 days (range: 11-45). The cumulative incidence (CI) of non-relapse-related mortality (NRM) was significantly higher in those with lower counts of pDC, moDC and mDC during the first 3 weeks after HSCT (46% for patients with less than 2.0 pDC/uL vs. 5% for patients with higher counts – p=0.003; 45% for patients with less than 77.0 moDC/uL vs. 5% for patients with higher counts – p=0.003; 45% vs 5% for patients with less than 4 mDC/uL – p=0,002). CI of grade II-IV Acute GVHD was significantly higher and overall survival was significantly worse in patients with lower counts of both pDC and moDC (p=0,02 and 0,01 respectively). The cell source, the age and the conditioning regimen did not affect any of the DC subpopulations counts. **Conclusion:** Low DC counts in the first weeks after HSCT are associated with increased non relapse related mortality. Also, low pDC and moDC counts are associated with higher incidence of acute GVHD. The mechanisms that rule the DC role on immunity deserve further investigations.

1191

### Low counts of CD4-CD8- T-cells during the first weeks after umbilical cord blood transplant

Gonçalves MV<sup>1</sup>, Yamamoto M<sup>1</sup>, Colturato V<sup>2</sup>, Ikoma MV<sup>2</sup>, Hamerschlak N<sup>3</sup>, Seber A<sup>4</sup>, Rocha V<sup>5</sup>, Orfao A<sup>6</sup>, Rodrigues CA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

<sup>2</sup> Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP

<sup>3</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

<sup>4</sup> Instituto de Oncologia Pediátrica - GRAACC Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

<sup>5</sup> Hospital Sírio-Libanês – HSL, São Paulo, SP

<sup>6</sup> Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

**Background:** CD3+CD4-CD8- T-cells can suppress alloimmune responses. However, the mechanisms by which these cells regulate immune responses and their role in the immune recovery after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) remain unknown. **Objectives:** To compare the distribution of different subsets of T-cells and NK cells after unrelated allogeneic transplant in patients receiving umbilical cord blood (UCB), bone marrow (BM), or peripheral blood stem cells (PBSC). **Methods:** T-cells (CD4+/CD8+/CD4-8-/CD4+8+), and NK cells subsets (lineage negative and 56+16-/56+16++) were quantified by multiparametric flow cytometry at 6 sequential time points (at engraftment, and at days 3, 7, 14, 21 and 60 after engraftment). Overall, 53 patients (34 male; median age 15y, range 1-74y) receiving a UCB (n=21), BM (n=22) or PBSC (n=10) HSCT from unrelated (n=48) or related donors (n=5) were studied. The most common diagnosis was acute leukemia (AML, 18 cases; ALL, 14; aplastic anemia/MDS, 11; other, 10). Most patients received myeloablative conditioning (MAC) regimens (n=38, 73%). Antithymocyte globulin (ATG) was used in 21 patients (40%) and total body irradiation (TBI) in 25 (47%). Median follow up time was 14 months. **Results:** As compared to BM/PBSC, UCB was associated with a delayed neutrophil engraftment (26 days vs. 16 days; p=.003), and a trend to lower counts of all T-cell in the first 3 weeks after engraftment. At day21 after engraftment, the median number of total T CD3+ cells was 113/uL for UCB vs. 582/uL for BM/PBSC recipients (p=.002). The median number of CD4-CD8- T-cell was significantly lower in UCB recipients as compared to BM and PBSC at all times during the first 3 weeks (median 0,5/uL vs. 8/uL at day 3, p=.005; 0,6/uL vs. 6/uL at day 7, p=.006; 0,7/uL vs. 7/uL at day14, p=.001; and 1/uL vs. 8/uL at day 21 after engraftment, p=.009). At day 60, Total T and CD4-8- cells counts still low UCB recipients (1,6/uL vs. 9/uL, p=.02) becoming comparable only at day 100 (8,2/uL vs. 30/uL, p=.08). This difference was maintained even when in the relative proportion of CD4-CD8- subset in relation to all T CD3+ cells. No significant differences were observed between both groups as regards the distribution of NK cells subsets at any time. There was no significant influence of MAC, ATG or TBI on the differences in T-cell counts observed between the two groups. **Conclusion:** UCB recipients have lower counts of CD4-/CD8- T-cells during the first weeks after HSCT as compared to BM or PBSC recipients. The impact of this finding on the transplant outcome remains to be determined.

1192

### Avaliação das células-tronco hematopoiéticas oriundas do transplante autólogo de medula óssea (pós – descongelamento), dos pacientes do Hospital Pedro Ernesto

Carneiro VA, Pessanha JM, Fabricio-Silva GM, Pôrto LC

Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro, RJ

O transplante de células-tronco hematopoiéticas autogênicas (CTH), é uma terapia que utiliza células-tronco hematopoiéticas do próprio paciente para o restabelecimento hematológico. Esse tipo de procedimento é cada vez mais utilizado em terapias mieloblásticas em doenças como: Linfomas e Mieloma Múltiplo. As células-tronco são coletadas do sangue periférico por leucoaférese após mobilização das células-tronco da medula óssea, com a utilização de fatores estimuladores da colônia de granulócitos (G-CSF) e/ou combinada com quimioterapia prévia, devendo ser preservadas até o momento da infusão. As CTHs coletadas são criopreservadas para posterior infusão, durante o processo de congelamento é adicionado o DMSO (dimetil sulfoxido) um crioprotetor que impede a formação de cristais intracelulares que poderiam causar a ruptura da célula. No entanto, esse crioprotetor é tóxico e causa uma série de reações adversas após o descongelamento e infusão de CTH para o paciente. Antes do processo de congelamento são feitos testes de quantificação celular para garantir a qualidade do enxerto através da determinação de células CD34+ nas bolsas coletadas por leucoaférese. Esse resultado representa o principal parâmetro utilizado na prática clínica para avaliação da qualidade do produto de células-tronco hematopoiéticas coletado de sangue periférico. **Objetivos:** Avaliar a quantificação das células CD45+/34+ antes do congelamento e após o descongelamento. **Métodos:** Foram analisadas dez bolsas de CTHs criopreservadas, utilizando marcadores de anticorpos monoclonais CD34 + e CD45 +, por citometria de fluxo, conforme protocolo ISHAGE. **Resultados e Conclusões:** Dos dados obtidos da análise das bolsas, a criopreservação dos produtos de leucoaférese de CTHs, com a concentração maior ou igual a  $2 \times 10^6$  células/mL não demonstrou ser prejudicial a recuperação hematopoiética no transplante autólogo. Obteve-se como resultado pouca perda celular da expressão dos antígenos avaliados (CD45/CD34) nas células quando comparadas as bolsas no período que antecede o congelamento. Essa perda celular mostrou-se irrelevante quanto ao sucesso no transplante. **Palavras-chave:** Células-tronco. Transplante autólogo. Criopreservação.

## 1193

### Células endoteliais do doador enxertam a medula óssea após transplante de medula óssea em modelo experimental

Bonfim-Silva R<sup>1,2</sup>, Souza LE<sup>1,3</sup>, Melo FU<sup>1,3</sup>, Covas DT<sup>1,3</sup>, Fontes AM<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy - INCTC, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP

<sup>3</sup> Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP USP, Ribeirão Preto, SP

O transplante de medula óssea (TMO) é uma terapia que consiste na infusão de células da medula óssea com o objetivo de restabelecer a função hematopoética nos pacientes com medula óssea danificada. A medula óssea consiste de três principais sistemas celulares, o hematopoiético (linhagem linfóide e linhagem eritro-mielóide), o endotelial e o estromal (células não hematopoiéticas de origem mesenquimal). Após o TMO as células tronco hematopoiéticas do doador enxertam a medula óssea do receptor e reconstitui o sistema hematopoiético. O objetivo deste trabalho foi avaliar em um modelo murino se após o TMO as células endoteliais do doador também enxertam a medula óssea do receptor para reconstituir o sistema endotelial. Camundongos C57BL6 foram letalmente irradiados com 10Gy e resgatados com a infusão intra-óssea de  $4 \times 10^6$  células GFP+ obtidas da MO de camundongos C57BL6/GFP. Para avaliação da eficiência do transplante,

trinta dias pós-TMO a medula óssea dos animais foi analisada por citometria de fluxo para quantificação de células GFP+ e por imagem *ex-vivo* baseado em fluorescência utilizando o aparelho IVIS. Células da medula óssea pós 30 dias de TMO foram cultivadas, e as células endoteliais foram isoladas por meio específico (EBM-2 + citocinas) e expandidas até a terceira passagem. Para investigar a origem das células endoteliais, foram realizadas análises morfológicas das células aderentes em cultura por microscopia de fluorescência observando-se a população portadora do GFP e a quantificação por citometria de fluxo de células GFP+/CD31+, classificadas como células endoteliais do doador e GFP-/CD31+, classificadas como células endoteliais do receptor. A medula óssea dos animais transplantados apresentou uma porcentagem de células GFP semelhante ( $90.9 \pm 0.87\%$ ) à do animal transgênico GFP ( $92.9\%$ ), com isso demonstrando uma eficiência do transplante. Entretanto, as tíbias e fêmures dos animais transplantados submetidos ao sistema de captura de imagem baseado em fluorescência, apresentaram uma taxa de eficiência de fluorescência em média 44x menor ( $2,77E-05 \pm 5,99E-06$ ) quando comparada a de um animal GFP ( $1,22E-03$ ). Isso pode ser explicado devido à emissão de fluorescência pela estrutura óssea dos animais GFPs, aumentando assim a taxa de eficiência do sinal. Na investigação da origem das células endoteliais pós-TMO, as análises morfológicas durante o cultivo mostraram que grande parte das células poligonais visualizadas eram GFP+. Estes achados foram confirmados por citometria de fluxo, o qual células GFP+/CD31+ mostraram uma porcentagem em média 14x maior ( $39,58 \pm 10,66\%$ ) quando comparado à porcentagem de células GFP-/CD31+ ( $2,75 \pm 0,9\%$ ,  $p=0,04$ ). Em Conclusão, este trabalho demonstra que células endoteliais do doador enxertam a medula óssea pós TMO em camundongos, sugerindo que o sistema endotelial da medula óssea do receptor é reconstituído por células endoteliais do doador.

## TRANSPLANTES: COMPLICAÇÕES

### 1194

#### Síndrome nefrótica como complicação após transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas: associação com doença do enxerto contra hospedeiro crônico e infecções virais

Mejia MM, Soares AM, Setubal DC, Sola CB, Oliveira MM, Bitencourt MA, Nabhan SK, Pasquini R, Malvezzi M, Funke VA

Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introdução:** Uma infrequente complicação do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é a doença renal crônica (DRC). Entretanto, com o aumento da sobrevida dos pacientes nos últimos anos, sua incidência também vem aumentando. A síndrome nefrótica é uma das síndromes clínicas mais comuns associadas à DRC em pacientes após TCTH. **Objetivo:** Relatar o quadro clínico e evolução de quatro pacientes submetidos a TCTH no Hospital de Clínicas – UFPR, e que evoluíram com síndrome nefrótica. **Métodos:** Estudo clínico retrospectivo, com revisão de prontuários de pacientes submetidos ao TCTH no HC – UFPR. **Resultados:** Quatro pacientes apresentaram síndrome nefrótica como complicação após transplante alogênico de medula óssea. Três deles eram homens, e uma mulher. A idade mínima ao transplante foi de 14 anos, e a máxima de 43. Todos os doadores foram irmãos, com compatibilidade HLA. Os pacientes apresentavam os seguintes diagnósticos: anemia aplásica (2), leucemia mielóide crônica (1) e leucemia mielóide aguda

(1). Condicionamento: Bussulfan (BU) 16 mg/kg e Ciclofosfamida (CFA) 120 mg/kg em dois pacientes; BU 12 mg/kg + CFA 120 mg/kg em um paciente e CFA 200 mg/kg em 1 paciente. Todos receberam imunoprofilaxia com metotrexate e ciclosporina. Três deles apresentaram doença do enxerto *versus* hospedeiro crônica extensa, e apenas um teve grau limitado, mas este apresentava concomitantemente infecção por vírus da hepatite C. Um paciente apresentou recidiva da doença de base, recebeu infusão de linfócitos do doador com posterior DECH crônica e desenvolvimento de síndrome nefrótica. Um paciente apresentava doença linfoproliferativa pós transplante causada por EBV e foi tratado com rituximab. Os demais receberam tratamento com corticosteróides. Três pacientes estão vivos e houve um óbito por choque séptico. O tempo de sobrevivência médio foi de 4.528 dias. **Conclusões:** A síndrome nefrótica e uma complicação infrequente do TCTH, porém geralmente relacionada a ocorrência de doença do enxerto contra hospedeiro crônica, sendo hoje reconhecida como uma de suas manifestações. Outras situações como infecções virais podem ainda causar esta complicação em receptores de TCTH.

## 1195

### Reavaliação retrospectiva da doença do enxerto contra hospedeiro

Santos GR, Furtado VF, Fagundes T, Nunes EC, Sola CB, Ioshii S, Setubal DC, Malvezzi M, Pasquini R, Funke VA

*Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR*

A Doença do Enxerto contra o Hospedeiro é importante causa de morbidade e mortalidade no transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). O desafio no diagnóstico e classificação desta complicação vem sendo abordado em todo o mundo através de estudos que procuram validar a classificação proposta pelo Consenso do NIH em 2005. Este estudo piloto tem por objetivo descrever retrospectivamente os principais achados clínicos em pacientes com diagnóstico de DECH confirmado por histopatologia nos últimos três anos e reclassificá-los (clínica e histopatologicamente) conforme a nova proposta. Numa segunda fase avaliaremos o impacto prognóstico destas mudanças. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR. Foram avaliados registros de 33 pacientes, que realizaram exame histopatológico no período de agosto de 2007 a 2010 e com evidência clínica de DECH cutânea, hepática e/ou gastrointestinal, sendo 24 do sexo masculino e 9 do feminino, com média de idade, ao transplante, de 20 anos. Dezoito pacientes receberam células de medula óssea (58%), 8 receberam de cordão umbilical (24%) e 6 receberam células obtidas do sangue periférico do doador (18%). Entre os diagnósticos, encontravam-se: 19 pacientes (58%) com hematopatias malignas e 14 pacientes (40%) por doenças benignas. A média de tempo de início dos sintomas de DECH após o transplante foi de 39 dias (S=54,2). Dos pacientes, 31 (94%) apresentaram manifestações cutâneas, sendo mais frequentes o rash maculopapular (72%), eritema (51%) e lesões liquenóides (55%), além de ceratose pilar (23%) e hiperpigmentação (19%); dos pacientes com alterações hepáticas (64%), a elevação de AST (85%) e ALT (81%) além do dobro do limite superior foi o achado mais comum; dos pacientes com acometimento gastrointestinal (58%), diarreia (84%), perda de peso (47%) e vômitos (42%) foram mais frequentes. Conforme o critério prévio ao NIH, 91% dos pacientes seriam considerados como tendo DECH aguda, sendo grave (graus III e IV) em 53%, ao passo que, pelo novo critério, 14 pacientes (42%) teriam DECH aguda (sendo 64% com grau III ou IV), 2 (6%) teriam DECH crônica clássica e 17 (52%) teriam a forma 'overlap'. Quanto a gravidade dos pacientes com DECH crônica, 5 (26,32%) foram classificados como portadores de forma moderada, e 14 (74%) apresentavam a forma severa pelo escore do NIH. A sobrevivência em 1 ano foi de 71% para pacientes

com DECH aguda e de 84% para DECH crônica, conforme a nova classificação; até o momento, 58% dos pacientes avaliados estão vivos. Este estudo demonstra significativas alterações na classificação da DECH conforme as recomendações do NIH. Maior amostragem permitirá correlações estatísticas com os achados clínicos, bem como avaliação prognóstica destes subgrupos.

## 1196

### Revisão dos achados histopatológicos em pacientes com suspeita clínica de doença do enxerto contra hospedeiro: um estudo piloto

Santos GR, Funke VA, Fagundes T, Furtado VF, Nunes EC, Sola CB, Oliva L, Pasquini R, Malvezzi M, Ioshi S

*Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR*

A Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH) apresenta diagnóstico difícil, sendo um desafio ao sucesso do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). A histopatologia é uma importante ferramenta na compreensão fisiopatológica e no diagnóstico da DECH. Entretanto, sabe-se que não é um método diagnóstico definitivo. Este é um estudo piloto retrospectivo de pacientes com DECH diagnosticada no Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC da UFPR com os Objetivos de reclassificar e descrever as alterações anatomopatológicas conforme a proposição do Consenso do NIH, e analisar a concordância com o diagnóstico clínico de DECH. Foram rastreados pacientes no registro do Serviço de Anatomia Patológica que realizaram biópsia de pele, fígado ou trato gastrointestinal (TGI). A partir de revisão de laudos e lâminas, levantou-se os critérios diagnósticos propostos pelo NIH quanto a esses três sítios, enquanto a evidência clínica de DECH foi verificada em registros médicos. Foram selecionados exames com requisições com suspeita clínica de DECH. Quarenta e cinco exames histopatológicos de 28 pacientes foram avaliados, no período de 2007 a 2010. Eram 19 pacientes do sexo masculino e 9 feminino, com média de idade de 17 anos e 9 meses, e com tempo médio do transplante à biópsia de 255 dias. Fonte de células: medula óssea (19 pac), cordão umbilical (7) e sangue periférico (4). Dos exames avaliados, 25 (55,6%) eram compatíveis com DECH, 12 (26,7%) eram negativos e 8 eram indeterminados. Doze (52%) das biópsias cutâneas eram condizentes com DECH, apresentando queratinócitos apoptóticos (100%) e vacuolização (75%) como principais achados, enquanto nos 4 (17,4%) não condizentes foram encontradas exocitose linfocitária e queratose laminar e nos 7 (30,4%) indeterminados, se observava infiltrado linfocitário perivascular, acantose (42%), queratinócitos apoptóticos (42%), vacuolização (42%), espongirose e edema de derme (28 e 14%). No fígado, um exame condizente apresentava colostase e inflamação portal e lobular, enquanto o outro caso, mais sugestivo de hepatite medicamentosa, apresentava tumefação hepatocitária e siderose. Dos 12 exames do TGI condizentes (60%), todos apresentavam células apoptóticas, destruição glandular (75%), ulceração (42%) e fibrose (17%), enquanto os exames não sugestivos cursavam com inflamação crônica (62%) e edema de córion (25%). Não havia exames indeterminados desse sistema nesta amostra. Havia 27 exames de pacientes com DECH crônico (classico ou overlap) sendo 17 (63%) com critérios mínimos para doença ativa e 8 (30%) também com critérios específicos. Destes, apenas 52% dos laudos liberados previamente eram compatíveis com DECH. Na pele (n=14), 57% das biópsias apresentavam critérios mínimos e 7% específicos. No fígado (n=2) os dois casos tinham apenas critérios mínimos. Em TGI (n=11) 64% das biópsias apresentavam critérios mínimos e também específicos. Embora muitos fatores possam interferir no resultado histopatológico, e da amostragem pequena, há importante fração de casos em que o exame patológico não confirma os achados clínicos. Deste modo, este deve ser considerado dentro de suas limitações como um

instrumento de apoio diagnóstico, apresentando um bom valor preditivo positivo e oferecendo a possibilidade de exclusão de outras situações diferenciais.

## 1197

### Cytomegalovirus infection and lymphopenia are associated with increased mortality post autologous stem cell transplantation

Almeida AM, Macedo EM, Bley CM, Kerbauy FR, Campregher PV, Odone V, Sobrinho J, Fernandes JF, Rodrigues M, Hamerschlag N, Santos FP

Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

**Introduction:** Despite preventive and therapeutic antiviral medication cytomegalovirus (CMV) infection is still a major cause of morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (SCT). Only limited data on CMV infection and disease are available in autologous SCT recipients. Previous studies have demonstrated that the probability of CMV infection is nearly 60% in seropositive patients and 23% in seronegative patients undergoing autologous SCT, but its impact in mortality is unclear. **Methods:** We retrospectively reviewed the medical records of 101 patients undergoing autologous SCT at Hospital Israelita Albert Einstein from January, 2005 to July, 2012. CMV infection was defined as a quantitative real time PCR assay showing greater than 165 copies and/or positive CMV pp65 antigenemia assay. Lymphocyte count was registered at 15<sup>th</sup> day after SCT and lymphopenia was defined as an absolute lymphocytes count (ALC) < 500 at that time point. Overall survival (OS) was estimated from the time of transplant until death, with surviving patients censored at last follow-up. Variables entered into the multivariate Cox analysis were those with a p-value < 0.10 in the univariate analysis. CMV infection was analyzed as a time-dependent covariate, considering the time to CMV infection. Statistical analysis was performed with STATA (v11.0) and alpha error was defined as 5%. **Results:** The majority of patients were male (62.4%) and the median age was 58 years old (range: 3-76). Peripheral stem cell harvest was the main source of cells (92%). A positive serological CMV status was found in 93.75% of patients. Most common indications for autologous SCT were multiple myeloma (34%), non-Hodgkin's lymphoma (40%) and Hodgkin's lymphoma (6%). After a median follow-up of 2 years, the OS for the whole cohort was 61% (95% confidence interval [CI] 48-72%). CMV infection post SCT was seen in 26% of patients. In the univariate analysis, development of CMV infection and presence of D15 lymphopenia were associated with a higher mortality (CMV infection-hazard ratio [HR] 3.32 [95%CI 1.61-6.84]; p= 0.001; D15 lymphopenia- HR 2.37 [95% IC 1.11-5.05]; p= 0.024). Patients who developed CMV infection in the setting of D15 lymphopenia had the worse outcome (2-years OS 19%; 95% CI 9-43%). D15 lymphopenia was not associated with a higher rates of CMV infection (p=0.41). In Cox multivariate analysis, lower overall survival was demonstrated in female patients (HR= 2.23, 95%CI 1.08-4.58; p= 0.029), in the presence of D15 lymphopenia (HR= 2.56, 95%CI 1.19-5.51; p= 0.016) and CMV infection (HR: 3.33, 95% IC1.61-46.86; p= 0.001). **Conclusion:** CMV infection post-autologous SCT is associated with a decreased survival, and in the concomitant presence of D15 lymphopenia appears to indicate a subgroup of patients with very poor outcome. It is possible that CMV infection does not lead directly to increased mortality, but is rather a surrogate marker of decreased immune function post-ASCT. Future studies should prospectively evaluate the incidence and prognostic impact of CMV infection post-ASCT and correlate with markers of immune recovery.

## 1198

### Avaliação prospectiva de pacientes onco-hematológicos submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas: análise da mortalidade precoce

Garnica M, Oliveira FS, Gondin V, Nucci M, Maiolino A

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** Transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) constitui uma modalidade de tratamento de diversas doenças hematológicas, porém por ser uma terapia que contempla altas doses de quimioterapia, existe um risco de óbito relacionado ao próprio procedimento, denominado mortalidade relacionada ao transplante (TRM). O tipo de TCTH (autólogo ou alogênico) e também a doença de base impactam neste risco de óbito, por tanto a TRM deve ser considerada no momento da indicação de um TCTH dependendo da doença de base. **Objetivos:** Determinar a TRM e a sobrevida global em pacientes transplantados e relacionar estes desfechos com a doença de base e o tipo de TCTH. Procedimentos metodológicos. Coorte prospectiva de pacientes submetidos a TCTH em uma instituição, com Programa de TCTH iniciado em 1994, contemplado TCTH autólogo e alogênico aparentado. Os dados de TRM (definida como mortalidade até o D+100 pós TCTH) e de sobrevida global foram calculados de toda a coorte. Posteriormente pacientes com óbito precoce foram comparados aos com sobrevida > 100 dias pós transplante quanto as seguintes variáveis: sexo, idade, doença de base, tipo de TCTH (autólogo ou alogênico), e tipo de célula tronco (sangue periférico ou medula óssea). **Resultados:** Entre 1994 e 2011 foram realizados 643 TCTHs, sendo 508 (79%) autólogos e 134 (21%) alogênicos. A mediana de idade foi de 43 anos, e 365 (57%) foram homens. A doença mais transplantada foi mieloma (N=269, 42%), seguido dos linfomas (N=227, 35%). TRM ocorreu em 75 pacientes. Destes 35 ocorreram em AutoTCTH (6,9%) e 40 entre AloTCTH (29,8%). A mediana da sobrevida global foi de 2225 dias., sendo de 3023 dias entre TCTH autólogo e de 606 dias em TCTH alogênico (p<0,001). A sobrevida global no D+365 (1 ano pós TMO) foi: 90%, 85% e 75% em pacientes em pacientes submetidos a TCTH autólogo para mieloma, linfoma Hodgkin e linfoma Não Hodgkin, respectivamente, e de 54%, 69% e 50% em pacientes submetidos a TCTH alogênico por Leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica e leucemia linfóide aguda, respectivamente. **Conclusão:** A TRM variou segundo o tipo de TCTH e também a doença de base. TCTH autólogo é um procedimento seguro e associada a longo tempo de sobrevida, enquanto o TCTH alogênico mesmo com maior TRM, associou-se a boa sobrevida global em um ano.

## 1199

### Incidência de infecção respiratória aguda por vírus em receptores de transplante de células tronco hematopoéticas

Silva AC<sup>1</sup>, Garnica M<sup>1</sup>, Motta F<sup>2</sup>, Zalis M<sup>1</sup>, Nucci M<sup>1</sup>, Maiolino A<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup> Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ

Os vírus respiratórios representam uma importante causa de morbidade em pacientes imunodeficientes, incluindo receptores de transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH). Influenza, vírus sincicial respiratório humano (HRSV), parainfluenza têm sido bem documentados neste contexto, ocorrendo com maior frequência nos meses de outono e inverno. Embora sejam responsáveis pela maioria das infecções do trato respiratório superior (UTRI), as

incidências relatadas variam muito entre os centros e os autores. Na última década, novos agentes patogênicos respiratórios têm sido descritos, tais como coronavírus, metapneumovírus, bocavírus e outros. Neste estudo, descrevemos a incidência de UTRI em pacientes pós TCTH em uma coorte de um ano e documentou a etiologia viral desses episódios usando um ensaio de PCR multiplex incluindo um painel de 16 vírus no aspirado nasofaríngeo (NFA). Um total de 121 pacientes foi incluído na coorte: 90 (74%) do tipo TCTH autólogo, mediana de idade de 51,5 anos (variando de 19 a 69) e 80% (N = 102) tiveram mais de 100 dias após o TCTH. Quarenta e sete pacientes (39%) desenvolveram pelo menos um episódio de UTRI. Um total de 75 episódios foi documentado em 47 pacientes. Os casos ocorreram, principalmente entre maio e agosto (N = 50; 67%). Não houve nenhum caso de pneumonia ou de morte relacionada à UTRI. NFA foram coletadas a partir de 58 episódios. Em 17 (29%) das amostras, pelo menos um vírus respiratório foi detectado. Episódios com coronavírus foram os mais frequentes (59%) entre os meses de maio e julho. Um pequeno número de casos de HRSV, influenza e parainfluenza foram observados. Um episódio de co-infecção (coronavírus e bocavírus) ocorreu em maio. Seis amostras de NFA foram coletadas de seis pacientes diferentes e não sintomáticos, como controle para o método, sendo todos negativos. Em Conclusão, embora em uma incidência baixa de UTRI, foi observada alta circulação de coronavírus nesses pacientes, e uma baixa incidência de outros vírus respiratórios.

## 1200

### Estudo de associação dos SNPs presentes nos genes *TLR4*, *TLR9* e *TIRAP* à infecções graves no transplante de células-tronco hematopoéticas autólogo de pacientes com MM

Trigo FM<sup>1</sup>, Luizon MR<sup>1</sup>, Dutra HD<sup>2</sup>, Scaffo MH<sup>1</sup>, Simões AL<sup>1</sup>, Maiolino A<sup>2</sup>, Nucci M<sup>2</sup>, Simões BP<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo – USP, SP

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** O número de pacientes onco-hematológicos submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) tem aumentado significativamente nos últimos anos, porém infecções bacterianas, virais e fúngicas são os principais obstáculos para o seu sucesso. TCTH aumenta a suscetibilidade do paciente à infecções devido a alterações imunológicas relacionadas ao regime de condicionamento. Mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia de células plasmáticas caracterizada pela produção de anticorpo monoclonal, destruição do osso e associada a altos riscos de infecções. A introdução do TCTH autólogo aumentou a sobrevida global, mas a infecção continua a ser uma importante complicação do procedimento. Estudos têm mostrado a importância dos Polimorfismos de única base (SNP) na região promotora e codificadora de genes de receptores imunológicos afetando a resposta imune. Mais recentemente, o papel dos SNPs dos genes dos receptores imunológicos das famílias do *Toll-like* e *TIRAP* foi evidenciado como de extrema importância na resposta imune inata. **Objetivo:** Avaliar e correlacionar a presença dos SNPs dos receptores *TLR4* e 9 e *TIRAP* em pacientes portadores de MM, submetidos ao TCTHA, às complicações infecciosas apresentadas por estes no período pré e pós-TCTHA. **Métodos:** Na análise clínica da infecção foram utilizados os parâmetros: febre de origem obscura (FOO), morte durante a fase de neutropenia, Fungemia e Bacteremia (bactérias G+ e G-), Superinfecção, Infecção fúngica invasiva (IFI). A genotipagem para os SNPs Asp299Gly e Thr399Ile do gene *TLR4*, -1237T/C e -1486T/C do *TLR9* e *TIRAP/MAL* S180L, foi feita a partir do DNA genômico de CTH de sangue periférico mobilizado de 148 pacientes de MM submetidos ao TCTHA, por técnica de PCR em Tempo Real. A Frequência dos

haplótipos foi estimada por Haplo.stats® e todas as demais análises foram realizadas por SPSS®. **Resultados:** Foi encontrada associação do genótipo heterozigoto para o *TLR4* 299 com FOO (*p*.0,043) e Bacteremia por G+ (*p*.0,047). Para o SNP *TLR* -1237, não foram encontradas nenhuma associação. O SNP *TLR9* -1486 foi associado com Fungemia (*p*.0,012) e IFI (*p*.0,030). Na análise dos genótipos TT+TC vs. CC para *TLR9* -1486 foi observada associação altamente significativa (*p*.0,0028 ; OR=0,036, 95% CI=0,0014 a 0,9309). Para a combinação TC+CC vs. TT, não foi observada associação (*p*.0,335, OR=0,356 95% CI =0,014 a 8,905). Nas mesmas análises com IFI, foi observada associação quando comparados os genótipos TT+TC combinados vs. o CC (*p*.0,008; OR=0,156, 95% CI=0,033 a 0,735). Nenhuma associação foi observada para o SNP *TIRAP/MAL* S180L. Na análise de haplótipos do SNPs do gene *TLR4* não foi encontrada nenhuma associação. Para os haplótipos do *TLR9* foram encontradas associação do H2 (-1237T/-1486C) à fungemia (*p*.0,034, OR=3,553, 95% CI=0,808 a 1,562) e do H4 (-1237C/-1486C) à IFI (*p*.0,040, OR=15,844, 95% CI=0,961 a 261,066). **Conclusão:** Os Resultados mostram que, apesar da suscetibilidade primária às infecções característica do MM, a presença das variantes dos genes estudados afetou significativamente a suscetibilidade destes pacientes às infecções graves afetando os Resultados do TCTH. Além disso, os Resultados da análise haplotípica indicaram que a interação destes polimorfismos podem ser mais importantes ao avaliarmos a resposta imune e suscetibilidade a infecções em TCTHA.

## 1201

### Sintomas e regime de condicionamento em pacientes submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Santos AX, Barban A, Trecco SM, Evazian D, Dullely FL

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP

**Introdução:** o uso de quimioterápicos no transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TCTHa) pode causar diversos sintomas, que ocasionam carências nutricionais se não houver intervenção precoce. **Objetivo:** verificar os sintomas relacionados à alimentação e o regime de condicionamento em pacientes submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas. **Métodos:** estudo retrospectivo realizado no ambulatório de transplante de medula óssea de um hospital público em São Paulo. Foram incluídos 47 pacientes atendidos por nutricionista entre os meses de julho de 2011 e maio de 2012, de ambos os sexos, com idades entre 21 e 59 anos, que tiveram a primeira consulta no período de 01 até 30 dias após a realização do TCTHa. Foram excluídos pacientes com idade inferior a 18 anos e/ou superior a 60 anos, transplante alogênico e consulta em período de dias superior ao estabelecido. Por meio de um banco de dados eletrônico foram coletadas as seguintes informações dos prontuários: nome, idade, sexo, diagnóstico, regime de condicionamento e sintomas relacionados à alimentação (estes referidos pelos pacientes). Para análise estatística descritiva utilizou-se o software IBM SPSS versão 19, 2010. **Resultados:** amostra com 47 pacientes, sendo 24 homens (51,1%) e 23 mulheres (48,9%), com média de idade ±desvio padrão (DP) de 46,2 ±9,2 anos, variando de 21 a 59 anos. Os pacientes foram atendidos por nutricionista em um período médio ±DP de 11,2 ±8,1 dias. Trinta e dois pacientes tinham Mieloma Múltiplo (68,1%); cinco, Linfoma não Hodgkin (10,6%) e dez, Linfoma de Hodgkin (21,3%). Os principais tipos de regime de condicionamento utilizados foram: BEAM, BEAM 400 e Mel 200, sendo que este foi utilizado para 65,9% dos pacientes (todos com o diagnóstico de MM). Trinta e dois pacientes relataram sintomas relacionados à alimentação (68,1% da amostra). Portanto, quinze

pacientes não apresentaram sintomas (31,9%). Foram relatados dez tipos de sintomas, predominando o relato de náuseas (50%) seguido por inapetência, disgeusia, vômitos, dor epigástrica, diarreia, disfagia, odinofagia, mucosite e flatulência. Estudos indicam que aproximadamente 50% dos pacientes submetidos a esse tipo de transplante apresentam náuseas e vômitos. A diarreia é comum nas primeiras semanas após o transplante devido ao condicionamento e antibioticoterapia e a mucosite é a complicação bucal mais frequente. Neste estudo, o maior relato de náuseas esteve entre os pacientes que foram submetidos ao regime de condicionamento Mel 200. **Conclusão:** a queixa de náuseas representou o sintoma mais frequente, o que também é relatado em estudos semelhantes. A maior parte dos pacientes foram submetidos ao regime de condicionamento Mel 200.

## 1202

### Mucormicose de evolução fatal em paciente com síndrome de Kostmann submetido a transplante de sangue de cordão umbilical: relato de caso

Alvarenga TG<sup>1</sup>, Kuwahara C<sup>2</sup>, Nichele S<sup>2</sup>, Ribeiro LL<sup>2</sup>, Koliski A<sup>2</sup>, Mousquer RT<sup>2</sup>, Noronha L<sup>3</sup>, Loth G<sup>2</sup>, Cunha CA<sup>2</sup>, Bonfim CM<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Liga Acadêmica de Hematologia e Oncologia, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>3</sup> Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introdução:** A Síndrome de Kostmann (SK) é uma causa rara de neutropenia congênita grave que se manifesta com recorrentes infecções bacterianas desde os primeiros dias de vida. Os pacientes (Pts) que não respondem a altas doses de fatores de crescimento (G-CSF) podem ser curados com o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH). **Objetivos:** Relatar o caso de um paciente (pct) com diagnóstico de SK submetido à transplante de sangue de cordão umbilical (TSCU) não aparentado (NAP) que evoluiu com complicações diversas, mucormicose e óbito. **Relato de Caso:** Masculino, 1 ano e 4 meses, com contagem de neutrófilos  $<500/\text{mm}^3$  desde o nascimento e história prévia de múltiplas infecções bacterianas graves tratadas com antibióticos por tempo prolongado. Em 06/08/2010, foi diagnosticado com SK (1 ano de idade) e iniciou tratamento com Filgrastim 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sem resposta adequada. Em 29/08/2011, aos 2 anos de idade, foi submetido a TSCU NAP de compatibilidade HLA 5/6 após regime de condicionamento com Busulfan, Ciclofosfamida e Globulina anti-timocítica. O número total de células nucleadas infundidas foi de  $14,9 \times 10^7/\text{kg}$  do peso do receptor. Imunoprofilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) foi feita com Ciclosporina e Corticoide. Em D+6, apresentou quadro febril, iniciando uso de meropenem e vancomicina. Evoluiu com disúria, dor abdominal (D+7), hematúria e persistência do quadro febril (D+11). Na ocasião, ecografia abdominal evidenciou distensão de alças intestinais. Evoluiu com evacuação mucosanguinolenta e persistência de febre sendo iniciado micafungina no D+15. Nesta mesma época, apresentou um PCR positivo para HHV6 em amostra sanguínea. No D+16, houve piora clínica com desenvolvimento de edema generalizado envolvendo principalmente membro inferior direito e bolsa escrotal. US abdominal demonstrou massa desde polo inferior do rim direito até pelve, além de linfonodomegalia generalizada até retroperitônio e trombose de veia ilíaca direita. Em 16/09 (D+18) realizou laparotomia exploradora, que evidenciou massa pétreia em hipogástrio sem possibilidade de ressecção. Foi transferido para UTI pediátrica, onde evoluiu com insuficiência renal progressiva (Cr 1,6 mg/dL, UR 149 mg/dL), disfunção hepática (BT 11 mg/dL), hematúria e hemorragia digestiva de grande volume. Houve piora progressiva do edema, particularmente em

região escrotal. Ecodoppler de vasos abdominais (19/09) mostrou fluxo mínimo em aorta e ausência de fluxo em veia cava inferior com gasometria arterial indicativa de acidose metabólica e hipercalemia. Evoluiu com parada cardíaca sem resposta e óbito em quadro clínico de insuficiência renal 22 dias após TSCU (20/09). Outras complicações observadas foram Mucosite grau II, cistite hemorrágica e hipertensão arterial. O laudo de necropsia indicou facite necrosante retroperitoneal em organização com mucormicose, comprometendo parede abdominal hipogástrica e bolsa escrotal. **Conclusão:** A mucormicose (zigomicose) é uma infecção fúngica oportunista incomum, agressiva e potencialmente letal. Tem caráter angioinvasivo, com rápida progressão para trombose e necrose tecidual. Pacientes com neutropenia grave e prolongada (como ocorre na SK) submetidos a TCTH são particularmente susceptíveis à ocorrência de mucormicose, sendo de imperativa importância considerar este risco potencial.

## 1203

### A importância do atendimento psicológico no transplante autólogo de medula óssea

Freire NC, Câmara RA, Costa RM

Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE

Atualmente, a modalidade de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) é o autólogo, na qual a medula do próprio paciente é utilizada como fonte de células hematopoiéticas para o tratamento de patologias, como mieloma múltiplo, linfomas e leucemias. Nesse contexto é de fundamental importância a atuação do psicólogo, pois a vivência dos pacientes e familiares diante da descoberta do diagnóstico, do tratamento e da indicação para o transplante acarretam medos, ansiedades, angústias e expectativas que precisam de um espaço de escuta clínica para serem elaborados. Ademais, há também demandas advindas da equipe de saúde que atende o paciente, como dificuldades dos profissionais em transmitir informações referentes ao tratamento, os obstáculos encontrados pela equipe em sua relação com os pacientes e familiares e a sensação de impotência perante o limite de seu saber. Com o objetivo de atender tais demandas, o psicólogo se vê no desafio de propor um método de trabalho que se articule com sua especificidade teórica, reconhecendo seus limites e contribuições. O presente estudo tem como objetivo refletir sobre a importância do atendimento psicológico no processo do TCTH. Considera-se relevante o acompanhamento em três momentos: no pré-transplante, durante o período de internação e no pós-transplante. No pré-transplante, o psicólogo deve realizar uma avaliação que se caracteriza por uma investigação diagnóstica do funcionamento psíquico do paciente, dispondo de recursos que irão direcionar sua conduta clínica. No período de internação, dois objetivos se destacam em seu trabalho: proporcionar um espaço de escuta onde o paciente e seus familiares possam verbalizar sua demanda emocional e contribuir para um maior entendimento por parte da equipe acerca das atitudes e comportamentos que o paciente possa vir a apresentar. No pós-transplante, visamos dar continuidade ao processo de elaboração do paciente a respeito de suas questões emocionais e avaliar como o paciente está lidando com as implicações e consequências do transplante. Os autores utilizados para fundamentar essa proposta de trabalho são os seguintes: Alberti (2005), Morretto (2006), Pallottino (2011) e Decat (2011). Desse modo, pretendemos favorecer a implementação de um serviço de psicologia no TCTH da referida instituição, que contemple todos os atores envolvidos, os pacientes, familiares e profissionais de saúde.



1204

### Long term follow up after hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi Anemia: analysis of 126 patients surviving more than 2 years after transplant

Bonfim C<sup>1</sup>, Ribeiro L<sup>1</sup>, Bitencourt MA<sup>1</sup>, Loth G<sup>1</sup>, Pilonetto D<sup>2</sup>, Pereira NF<sup>2</sup>, Malvezzi M<sup>2</sup>, Pasquini R<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introduction:** Fanconi Anemia (FA) is usually inherited as an autosomal recessive disorder characterized by progressive pancytopenia, congenital abnormalities and a striking predisposition to the development of cancer. HSCT is the only treatment able to cure the hematological complications of FA. Outcome improved dramatically over the past decade and many patients are now long term survivors. **Objective:** We retrospectively analyzed the outcome of Fanconi Anemia Patients surviving two or more years after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Methods:** 126 pts survived 2 or more years after Hematopoietic Stem cell Transplantation and were included in this study. All patients were transplanted in Curitiba-Brazil from 10/1983 to 10/2009. The following data were evaluated: Year of transplant, gender, stem cell source, preparatory regimen, acute and chronic Graft *versus* host disease and malignancies. **Results:** 126 patients were transplanted at a median age of: 10 (3 – 34). Sixty patients were female and 66 patients were male. Type of preparatory regimen: Cyclophosphamide(CY) 60-200mg/kg +/- ATG: 92pts; CY 60mg/kg + Fludarabine +/- ATG: 30pts; Low dose TBI regimen: 4pts; Type of donors: Siblings: 83pts; other related: 11pts; Unrelated: 32 pts. Stem cell source: bone marrow: 110pts Cord blood: 15pts Peripheral blood: 1pt. HLA compatibility: 113 pts were matched and 13 pts had one or more mismatches. 109 pts are alive between 2 and 22 years after transplant (M: 7,3 ys). Patients surviving 2 years or more after transplant had a chance of 93% of being alive at 5 years and 87% at 10 years after transplant. No difference in survival was observed according to gender, ABO incompatibility, HLA compatibility or preparatory regimen. Age below 11 years at the time of transplant as well as acute GVHD grade II-IV and Chronic GVHD were significantly associated with a lower survival. 18 pts died from 871 – 7169 days after transplant(M: 2148 days). Chronic GVHD and infections as well as malignancies were the most frequent causes of death. Eleven pts developed squamous cell carcinoma of the tongue and only three are alive (one patient has active disease). Patients with Chronic GVHD developed this complication much earlier and at a younger age than pts that did not have Chronic GVHD. One patient developed a malignant cerebral tumor (died after neurosurgery) and 2 pts had basal cell carcinoma (both are alive). Three pts became pregnant and one had a normal child. **Conclusions:** FA is a multisystem disease and regardless of treatment received, all patients need to undergo life-long regular screening. The complications may be inherent to FA or its treatment and include those arising from congenital abnormalities, endocrinological and reproductive issues, malignancies, iron overload from multiple transfusions, prolonged androgen therapy and stem cell transplantation.

1205

### Development of BK virus-associated hemorrhagic cystitis is associated with decreased survival post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Bautzer V, Santos FN, Oliveira EA, Macedo EM, Kerbauy FR, Odone V, Ribeiro AF, Fernandes JF, Hamerschlag N, Santos FP

Centro de Oncologia e Hematologia, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

**Introduction:** Infection by BK virus in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (ALLO-HSCT) setting is associated with the development of hemorrhagic cystitis (HC), which is a major cause of morbidity. There are few studies evaluating the impact of BK virus-associated HC on survival post allo-HSCT. **Objectives:** To evaluate the incidence of HC by BK virus in patients after allo-HSCT and its impact on survival. **Methods:** We retrospectively reviewed the medical charts of 107 patients who underwent allo-HSCT at Hospital Israelita Albert Einstein from July 2007 until November 2011. HC was defined by the presence of any degree of unexplained hematuria and positivity for BK virus in a urine sample by quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay. Three patients were excluded because PCR results for BK virus were inconclusive, with 104 patients being analyzed in the final cohort. Cumulative incidence (CI) of HC, CMV reactivation and acute graft-*versus*-host disease (GVHD) was estimated taking into account the competing risk of death. Overall survival (OS) was estimated by the Kaplan-Meier method. Gray model was used for regression analysis of factors associated with the development of HC. Hazard ratios (HRs) were estimated by a Cox multivariable proportional hazards model, considering HC, CMV reactivation and acute GVHD as discrete time-varying covariates. **Results:** Median age was 28 years (range 6 months-76 years), and 60.5% of patients were male. Source of HSCs included matched related donors (37%), 10/10 HLA-matched unrelated donors (24%) and cord blood/haploidentical donors in 39%. The conditioning regimen was myeloablative in 81% of cases. The median *follow-up* of the whole cohort was 450 days. At 1 year, the cumulative incidence of HC was 30.5% (95% confidence interval [CI] 21.8% -39.7%). The 1-year incidence of CMV reactivation and acute GVHD (all grades) was 57.1% and 39.7%, respectively. In a multivariate analysis taking into account age, sex, risk of disease, source of HSCs, intensity of conditioning, CMV reactivation and acute GVHD, only receiving cells from cord blood/haploidentical donors was associated with an increased incidence of HC (subhazard ratio 4.04, 95% CI 1.31-12.49,  $p = 0.015$ ). The 1 year-OS of the whole cohort was 55% (95% CI 44-62%). Patients who developed HC had an inferior OS (1 year: 18% vs. 70%; HR= 4.40,  $p < 0.0001$ ; 95% CI 2.37-8.14). In the multivariate Cox analysis for OS, after adjusting for age, sex, disease risk, source of HSCs, intensity of conditioning, CMV reactivation and development of acute GVHD, development of HC was associated with an increased mortality (HR=4.84,  $p < 0.0001$ ). **Conclusion:** In our cohort, the development of HC was associated with an inferior OS in patients undergoing allo-HSCT. Even after adjusting for several variables, including development of acute GVHD and CMV reactivation, HC still remained an important factor associated with decreased survival. It is possible that HC is not the direct cause of the increased mortality, but is rather a surrogate marker of a state of severe immunosuppression and increased risk of dying in the post-transplant setting. Nonetheless, our results suggest that the development of BK virus-associated HC in allo-HSCT patients is associated with inferior survival and future studies should confirm this finding and seek strategies to prevent this complication.

**TRANSPLANTES: RESULTADOS****1206****Banco de sangue de cordão umbilical e placentário – uma realidade no serviço público do Ceará**Araújo LC<sup>1</sup>, Solon VR<sup>1</sup>, Moura RM<sup>1</sup>, Mendonça WB<sup>1,2</sup>, Brito AF<sup>1,2</sup>, Bruno NM<sup>3</sup>, Duarte FB<sup>3</sup>, Gomes FV<sup>1</sup>, Carlos LM<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE, Fortaleza, CE<sup>2</sup> Secretaria de Saúde do Estado do Ceará – SESA, Fortaleza, CE<sup>3</sup> Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE

**Introdução:** O Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – BSCUP da Rede Brasilcord, situado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE, iniciou suas atividades em abril de 2012. O BSCUP é um banco público que tem como objetivo a captação de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) doado voluntariamente. O SCUP é fonte de células progenitoras hematopoéticas (CPH), assim como a medula óssea. As CPH desempenham um papel importante na reconstrução da medula óssea pós quimioterapia mieloablativa. Assim, o SCUP tem se mostrado uma fonte de CPH alternativa à medula óssea no transplante alogênico não aparentado, aumentando as chances de um candidato a transplante de medula óssea (TMO) achar um doador compatível. **Objetivos:** Relatar a experiência do BSCUP-CE em coletar, processar e criopreservar as unidades de SCUP doadas e em realizar os exames necessários para garantir a qualidade das CPH para transplante. O BSCUP-CE objetiva contribuir, com as características genéticas da região, na formação de uma Rede de BSCUPs que represente geneticamente toda a população brasileira. **Métodos:** As mães candidatas a doadoras de SCUP devem ter idade acima de 18 anos, duas consultas pré-natais documentadas, idade gestacional igual ou superior a 35 semanas, bolsa rota há menos de 18 horas e ausência de processo infeccioso que possa interferir na vitalidade placentária. O SCUP é coletado, após triagem, em uma das maternidades credenciadas na rede Brasilcord e transportado para o BSCUP em caixa térmica apropriada, contendo bateria de gelo e registrador de temperatura. No laboratório de processamento do BSCUP, o SCUP é registrado e processado para concentração de CPH. Após a adição do crioprotetor (DMSO/dextrano), as CPH são criopreservadas em tanque de nitrogênio líquido automático (Bioarquivo) sob congelamento programado, atingindo a temperatura mínima de 196°C negativos. Durante o procedimento, são separadas amostras para realização de exames como sorologia da mãe, eletroforese de hemoglobina da mãe e do recém-nascido (RN), tipagem sanguínea e HLA do RN, quantificação de células CD34<sup>+</sup> e viabilidade do SCUP, e hemocultura para bactérias aeróbicas e fungos. São armazenadas em freezer a 80°C negativos amostras de DNA da mãe e do RN, plasma e RNA do RN e soro materno para futuros estudos. Os exames sorológicos investigam doenças como hepatite B e C, chagas, sífilis, HIV1/2, HTLV-I/II, toxoplasmose e citomegalovírus. **Resultados:** Atualmente, o BSCUP-CE possui nove unidades de SCUP coletadas e criopreservadas, sendo que três já foram liberadas para o Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea – REDOME, onde é realizada a busca de compatibilidade de HLA entre doador e receptor. **Conclusão:** O BSCUP-CE vem desempenhando suas atividades com qualidade, contribuindo com a representação genética da região e aumentando as chances de pacientes serem beneficiados com o transplante de CPH.

**1207****Unidade de criobiologia do HEMOCE: Resultados do estudo de 72 pacientes candidatos ao TMO autólogo**Solon VR<sup>1</sup>, Araújo LC<sup>1</sup>, Moura RM<sup>1</sup>, Mendonça WB<sup>1,2</sup>, Lucena HB<sup>1,2</sup>, Bezerra RP<sup>1,2</sup>, Matos DM<sup>1,2</sup>, Duarte FB<sup>3</sup>, Gomes FV<sup>1</sup>, Carlos LM<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE, Fortaleza, CE<sup>2</sup> Secretaria de Saúde do Estado do Ceará – SESA, Fortaleza, CE<sup>3</sup> Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE

**Introdução:** O transplante de medula óssea tem trazido contribuições relevantes para a terapêutica de doenças oncohematológicas por ser viável para curar ou prolongar a vida de muitos pacientes. Desde o início de suas atividades, em agosto de 2008, o Serviço de Criobiologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE vem realizando a criopreservação e armazenamento de células progenitoras hematopoéticas (CPH) de pacientes atendidos no Serviço de Transplante do Hospital Universitário Walter Cantídio – HUWC. **Objetivos:** Relatar a experiência com a criopreservação de células progenitoras hematopoéticas de 72 pacientes portadores de patologias oncohematológicas. **Métodos:** O estudo envolve pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e tumor de células germinativas (seminoma). Os pacientes são mobilizados com G-CSF, associado ou não a quimioterapia. em concentrações variando de 10 a 16 µg/Kg. A coleta das CPH é realizada por aférese e a quantificação das células CD34<sup>+</sup> é feita por citometria de fluxo. Após aférese, concentra-se a fração de células progenitoras e adiciona-se DMSO (5%), solução de criopreservação não ativada contendo HES (6%) e albumina humana (20%). A partir de outubro de 2011, a técnica foi modificada e passou-se a adicionar às células progenitoras concentradas DMSO (10%), plasma autólogo (20%) e Plasmin - HES (20%). Após a adição da solução crioprotetora ativada realiza-se o congelamento simples em freezer mecânico a 80°C negativos. A viabilidade celular é testada pelo azul de Trypan antes e após descongelamento das CPH para infusão. **RESULTADOS:** Cinquenta e quatro (75%) pacientes apresentaram número suficiente de células CD34<sup>+</sup> (superior a 2,0 x 10<sup>6</sup>/Kg); em 18 (25%) não houve bom rendimento. Dezesesseis pacientes fizeram duas ou mais mobilizações. Os fatores preditivos negativos preponderantes foram o tempo de diagnóstico da doença, o momento da indicação do transplante e a realização de mais de dois esquemas de quimioterapia. A viabilidade celular pós descongelamento variou entre 90 e 100%, e apenas um paciente apresentou 80% de recuperação. **Conclusão:** O processo de concentração e criopreservação mostrou-se eficaz na recuperação e preservação das CPH para a realização do transplante.

**1208****Avaliação da viabilidade de células progenitoras periféricas armazenadas em freezer mecânico por período superior a 24 meses**

Brum DE, Rodriguez DM, Bpbrum LM, Barison MA

*Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – SCPA, Porto Alegre, RS*

**Introdução:** Não há estudos que definam categoricamente o tempo máximo de armazenamento de células progenitoras periféricas (CPP) em freezer mecânico. Tem sido uma prática o seu uso por até 24 meses. Alguns estudos tem demonstrado sucesso terapêutico com material armazenado há mais de 60 meses, a partir da análise de viabilidade e contagem de unidades formadoras de colônias. A opção por freezer mecânico se faz em fun-

ção do custo elevado e preparo necessário para congelamento programado em tanques de nitrogênio. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade de CTP armazenadas em freezer mecânico no Serviço de Hemoterapia da Santa Casa de Porto Alegre, em amostras armazenadas no período de março de 2000 a novembro de 2008. **Métodos:** Foram analisados 33 amostras a partir das bolsas de criopreservação. Os médicos do Serviço de Hematologia foram contatados sobre os pacientes que tinham material armazenado solicitando a permissão para uso. No período entre 2000 e 2007, as coletas eram realizadas em máquina de aférese da Baxter e a partir de 2008 coml Cobe Spectra. As amostras foram descongeladas à 37°C e analisadas a viabilidade pela técnica de TRIPAM BLUE, entre os meses de maio e junho de 2012. As unidades coletadas foram armazenadas com concentração de DMSO a 7,5%, com HES 16,6% e albumina. Os dados foram analisados em planilha de Excel. **Resultados:** Das 33 amostras analisadas, apenas 24%(n=10) tinham viabilidade superior a 50%, sendo que a coleta mais antiga (03/2000) a viabilidade foi de 10,8% e a mais recente, de novembro de 2008 foi de 57%. O tempo médio de armazenamento foi de 6 anos (DP 1,21) e a viabilidade média de 36,9% (DP 0,18). Quando analisamos as amostras que tiveram viabilidade < 50% (76%) verificamos que a média da viabilidade foi de 26,2% (DP 12%) e tempo médio de armazenamento de 6,84 anos(DP 2). Porém, na avaliação das amostras com viabilidade superior a 50%, observamos que o tempo médio de armazenamento foi de 6,16 anos (DP 2) e viabilidade média de 60%(DP 7). Quanto as patologias, 60,6% eram pacientes com Mieloma Múltiplo (n=20) - (MM), 18,2% era Linfoma Não-Hodgkin (n=6) (LNH), 9,1 % era Neuroblastoma, 6% eram doadores saudáveis, 3% Rabdomyosarcoma e 3% Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Quando analisamos as amostras viáveis, verificamos que a frequência de MM e LNH foi de 30% para cada uma delas(as outras com 10% cada uma). Nas amostras com viabilidade < 50%, verificamos que a frequência de MM era maior (n= 16 - 69,6%) seguida do LNH - 13,1%(n= 3). **Conclusão:** Verificamos a necessidade de continuidade do estudo para que possamos ter mais clareza na definição do tempo máximo de armazenamento, considerando a viabilidade mínima de 50%.Pode haver uma correlação entre o MM e menor viabilidade ao longo dos anos, o que poderia estar relacionado a maior quantidade de células que são coletadas nesta patologia, principalmente granulócitos.

## 1209

### Comparação entre os Resultados obtidos em pacientes submetidos a um único procedimento de aférese para coleta de células tronco periféricas com aqueles que realizaram dois procedimentos

Brum DE, Barison MA, Brum CP, Bpbrum LM

Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – SCPA, Porto Alegre, RS

**Introdução:** Verifica-se o crescente papel das Celulas Progenitoras Perifericas obtidas por aférese na reconstrução da hematopoiese. Isto tem exigido avanços tecnológicos dos SH e aperfeiçoamento de seu corpo técnico para a qualificação da coleta, sua manipulação e armazenamento. **Objetivo:** Apresentar os dados referentes ao perfil dos pacientes, frequência das patologias, quantidade de células CD 34 + previas a coleta, a total de Células CD 34+, suporte transfusional e tempo para pega. **Métodos:** Foram avaliados 67 pacientes adultos que realizaram coleta de células tronco periféricas (CCTP) (1 a 2 coletas) na Santa Casa de Porto Alegre, no período de 01/01/2010 a 31/12/2011 com as seguintes patologias: Mieloma Múltiplo (MM), Linfoma de Hodgkin (LH) e Linfoma não-Hodgkin(LNH). Os dados foram colocados em planilha Excel e avaliados. Em todos os pacientes foi utilizada a maquina COBE SPECTRA, com processamento de 3 volemas sanguíneas. **Resultados:** 36 pacientes (53,7%) realizaram ape-

nas 1 coleta (grupo 1) A frequência do gênero masculino neste grupo foi de 49,8% e feminino de 50,2%. No grupo que realizou 2 coletas (grupo 2), a frequência pacientes masculinos foi de 66,3% e feminino 33,7%. A idade média no grupo 1 foi de 45 anos e no grupo 2 foi de 47,6 anos. A patologia mais frequente no grupo 1 foi o Mieloma Múltiplo (58%), LNH -29,4% e LH- 17,7%. No grupo 2 a mais frequente também foi MM – 47,6%, seguida de LNH 37,7% e LH- 14,6%. Quanto a radioterapia previa as coletas, no grupo 1 foi identificada em 53,3% dos pacientes e no grupo 2 em 52,2%. Com relação aos dados laboratoriais, verificamos que no grupo 1, a quantidade de CD 34 + prévio a coleta foi de 82,7 cel CD 34+/ml, enquanto que no grupo 2 foi de 37,5 cel CD 34+/ml. Quando avaliamos a quantidade de plaquetas pré-procedimento, verificamos que no grupo 1 a media era de 224.000 mm<sup>3</sup> e no grupo 2 foi de 158.000 mm<sup>3</sup>. A quantidade média de plaquetas na pega do grupo 1 foi de 34.000mm<sup>3</sup> e no grupo 2 foi 27.000mm<sup>3</sup>. Entretanto, quanto avaliamos o tempo de pega entre os 2 grupos, verificamos que não há diferenças, pois no grupo 1 foi de 11,6 dias e no grupo 2 foi de 11,2dias. Quanto ao suporte transfusional, verificamos que no grupo 1 a media de concentrado de hemácias foi de 1,8 unidades no grupo 1 e de 1,6 unidades no grupo 2. Com relação a concentrado de plaquetas, o grupo 1 fez em media 3,5 pools de plaquetas e o grupo 2 transfundiu 3,3 pools. **Discussão:** No final de 2009 definimos em nosso Serviço um valor de CD 34 minimo para coleta de 25 cel/ul. Isto fez com que reduzíssemos o custo relacionado à coleta. Neste período, deixamos de coletar 9 pacientes e apenas 1 não conseguiu o n° necessários de células CD 34 para transplante, definido pelo Serviço e com o grupo de Hematologia, >= 2 x 10<sup>6</sup> /kg peso receptor. Verificamos que os pacientes que fizeram apenas 1 coleta tinham os valores mais altos de CD 34 no dia da coleta acompanhado de valores de plaquetas prévios também mais altos. Apesar de ainda não termos concluído análise estatística dos dados apresentados, verificamos que o n° de coletas não teve impacto na pega nem no suporte transfusional em nosso estudo, mas com efeitos positivos no que tange os custos e bem estar dos pacientes.

## 1210

### Uso da PCR em tempo real para diagnosticar a reativação do HCMV em pacientes recetores de células tronco hematopoiéticas

Peres RM<sup>1</sup>, Andrade PD<sup>1</sup>, Bonon SH<sup>1</sup>, Costa CR<sup>1</sup>, Franco JC<sup>1</sup>, Alves WR<sup>1</sup>, Vigorito AC<sup>2</sup>, Aranha FJ<sup>2</sup>, Souza CA<sup>2</sup>, Costa SC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, SP

<sup>2</sup> Unidade de Transplante de Medula Óssea, Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, SP

**Introdução:** As infecções são uma das principais complicações do TCTH. 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. A morbidade e a mortalidade das infecções virais podem variar de acordo com o tipo de transplante, grau de parentesco entre doador e receptor e fonte de célula-tronco (medula óssea, sangue periférico ou sangue de cordão umbilical). Entretanto, o período de ocorrência dessas infecções é geralmente bem consistente. Em situações de imunodepressão, como ocorre após o regime de condicionamento e na profilaxia e tratamento da DECH, é frequente a reativação de infecções latentes. A reativação do HCMV ocorre com maior prevalência entre os dias +30 e +120 pós-TCTH. Esta previsibilidade da ocorrência permite que estratégias de diagnóstico e intervenções precoces sejam adotadas nestes pacientes. **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. **Métodos:** 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 em 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 ( $10^7$  –  $10^2$ ) em triplicata obtendo-se eficiência de 0,93 e  $R^2$  igual a 0,9998. Várias amostras foram testadas em triplicatas em diferentes corridas, observando-se diferença mínima entre os valores de Cycle Threshold (CT), comprovando a reprodutibilidade dos Resultados. Até o presente momento 35 pacientes foram incluídos no estudo, com mediana de idade de 42 anos (14 – 68). A doença de base predominante foi leucemia mieloide aguda (LMA) acometendo 10 pacientes. Dos 35 pacientes apenas 11 pacientes apresentaram antigenemia positiva (11/35 – 31,5%). A PCR em tempo real ainda não foi realizada em todas as amostras. Dos 18 pacientes que tiveram suas amostras submetidas à amplificação gênica do HCMV, apenas 1 não apresentou positividade (positividade 17/18 – 94,5%). Os dados encontrados evidenciam correlação entre os Resultados de antigenemia e carga viral do HCMV pela PCR em tempo real. **Conclusão:** A padronização da PCR em tempo real foi conseguida com êxito. Após a realização da PCR em tempo real em 309 amostras observou-se concordância com os Resultados da antigenemia. **Apoio financeiro:** Fapesp.

## 1211

### Avaliação do quimerismo em pacientes com anemia aplástica severa após 18 meses do transplante de células tronco hematopoéticas exibindo regeneração hematológica completa

Quiroga MR, Pereira NF, Bitencourt MA, Silva RD, Pasquini R

Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introdução:** Vários fatores influenciam na sobrevivência de pacientes com anemia aplástica severa (AAS) pós transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), como idade do receptor, intervalo entre diagnóstico e transplante, nº de transfusões prévias, tipo de condicionamento e nº de células infundidas. Quimerismo pós TCTH é influenciado pela intensidade do regime de condicionamento e conteúdo celular do enxerto. **Objetivo:** Avaliar os níveis de quimerismo em pacientes com AAS com mais de 18 meses de acompanhamento pós TCTH, que apresentavam níveis hematimétricos dentro dos limites da normalidade no sangue periférico. **Métodos:** Estudo retrospectivo de 120 pacientes com AAS submetidos ao TCTH no HC-UFPR entre 1987 e 2011 (17 receberam 2º transplante). Os pacientes foram divididos em três grupos conforme regime de condicionamento e nº de transfusões prévias ao transplante. **Grupo I:** ciclofosfamida (CFA) <16 transfusões (N=51; 7/51 com 2º TCTH); **Grupo II:** CFA ≥16 transfusões (N=14; 3/14 com 2º TCTH); **Grupo III:** CFA associada ao bussulfano (BUS) ≥16 transfusões (N=55; 7/55 com 2º TCTH). Cada grupo foi subdividido em níveis de quimerismo: ≤50% doador; 51 a 90% doador e >90% doador. O nível de quimerismo foi determinado por amplificação

de locos VNTRs/STRs com detecção dos fragmentos em gel de poliácridamida até 2009 (96 pacientes) e após por eletroforese capilar em Analisador Genético de DNA (24 pacientes). Os níveis de quimerismo foram correlacionados com variáveis pré-transplante (idade, sexo, intervalo entre diagnóstico e TMO, imunossupressão prévia e nº de células infundidas) e evolução pós-transplante (nº de neutrófilos, plaquetas e hemoglobina atuais). Na análise estatística foram usados testes de Qui-quadrado, t de Student, ANOVA e Kruskal-Wallis (significância de 0,05). **Resultados:** no grupo I, achados de quimerismo foram >90% em 26 (51%) pacientes, entre 51 e 90% em 10 (19,6%) e ≤50% em 15 (29,4%). No grupo II, 8 (57,1%) pacientes mostraram quimerismo >90% e 6 (42,9%) ≤50%. No grupo III, observou-se 49 (89,1%) com quimerismo >90% e 6 (10,9%) entre 51 e 90%. Na análise univariada do grupo I, o nº de células infundidas, nº de neutrófilos e contagem de plaquetas diferiram com significância estatística entre os pacientes com quimerismo ≤50%, 51 a 90% e >90% ( $p=0,001$ ;  $p=0,005$ ;  $p=0,003$ , respectivamente), sendo mais elevados naqueles com maior grau de quimerismo. Nos grupos I e II, pacientes sem imunossupressão prévia apresentaram maior grau de quimerismo em relação aos que receberam imunossupressão ( $p=0,001$  e  $p=0,005$ ). Nos pacientes do grupo III, aqueles com quimerismo >90% apresentaram nº de neutrófilos e plaquetas mais elevados comparados aos com quimerismo 51 a 90% ( $p=0,020$  e  $p=0,011$ ). Para os demais parâmetros avaliados não houve diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. **Conclusão:** Na casuística estudada, os pacientes que apresentam níveis hematimétricos normais após 18 meses do TCTH com doador aparentado, a recuperação autóloga foi encontrada em 29,4% e 42,9% dos que receberam apenas ciclofosfamida com <16 transfusões e ≥16 transfusões, respectivamente e em nenhum dos pacientes que receberam a combinação de BUS e CFA. Estes achados reforçam que a recuperação autóloga da hematopoese depende da intensidade da imunossupressão exigida para cada caso.

## 1212

### Estado nutricional de pacientes submetidos a transplante de medula óssea

Pereira AZ, Campregher PV, Mfpiviocari S, Lucio F, Tanaka M, Morelli LR, Ferron RM, Ribeiro AA, Silva OS, Hamerschlak N

Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

**Introdução:** O estado nutricional dos pacientes submetidos ao Transplante de Medula Óssea é um indicador de prognóstico e de sucesso desse procedimento. A desnutrição protéico-calórica e a obesidade aumentam os riscos de comorbidades, mortalidade, o tempo de uso de imunossupressores e desenvolvimento de GVHD. **Métodos:** Foram estudados 250 pacientes submetidos a Transplante de Medula Óssea (TMO) no Hospital Israelita Albert Einstein, em São Paulo no período de 2007 a 2012. Realizamos a classificação do estado nutricional dos pacientes através do Índice de Massa Corporal (IMC)(kg/m<sup>2</sup>). **Resultados:** Foram encontrados 22% de pacientes com IMC normal; 37% de sobrepeso; 26% de desnutridos; e 15% de obesos. A média de IMC mais baixa foi encontrada entre os pacientes submetidos ao TMO Haploideítico, nas mulheres e nos pacientes com Talassemia, SCID e IPEX. **Conclusão:** Embora o estado nutricional dos nossos pacientes sejam compatíveis com os encontrados na literatura científica. A associação de desnutrição e obesidade com riscos de morbimortalidade, é um fator que pode sofrer intervenções. Medidas de melhora do estado nutricional devem ser tomadas pela equipe multidisciplinar e avaliadas constantemente, visando uma redução dos riscos do paciente e aumento do sucesso do tratamento.

1213

### Transplante de células tronco hematopoéticas em mielofibrose

Funke VA, Furtado VF, Santos GR, Sinamura L, Fagundes T, Setubal DC, Sola CB, Nunes EC, Pasquini R, Malvezzi M

Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

O TCTH alôgênico é indicado para pacientes portadores de Mielofibrose de alto risco ou risco intermediário 2 e nos pacientes portadores de Policitemia Vera ou Trombocitemia Essencial que tenham evoluído para mielofibrose com características de alto risco. Os Resultados dor TCTH alôgênico com condicionamento mioablativo parecem ser melhores para os pacientes com idade abaixo de 45 anos, havendo um menor risco de recidiva. No entanto, Resultados recentes com condicionamento de intensidade reduzida para 45-65 anos tem se mostrado bastante promissores. Este estudo tem por objetivo descrever uma série de pacientes com diagnóstico de mielofibrose transplantados no HC-UFPR e no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG). **Métodos:** no período de 1984 a 2011, foram transplantados 14 pacientes com diagnóstico de MF, sendo 11 no HC-UFPR e 3 no HNSG. A mediana de idade foi de 42 anos (10-51). Sexo masculino: 10 pacientes, feminino: 4 pacientes. Mediana de 5 transfusões (0-61). Sexo masculino com doador feminino: 5 pacientes. Mediana de duração de doença: 20 meses (2-150). Todos os pacientes apresentavam risco alto ou intermediário 2, segundo a classificação de Dupriez. Condicionamento: Fludarabina 125 mg/m<sup>2</sup> + Melfalan 140 mg/m<sup>2</sup> (6 pacientes); BU + Cy (4 pacientes); CY + TBI (1), Flu + Mel + ATG (2pac.), Flu 180 + BU 10 + ATG 5mg/kg (1pac.). Fonte de células: mo (7 pac.), sp (7 pac.). Mieloablativo: 5 pacientes; Intensidade reduzida (RIC): 09 pacientes. Dois pacientes receberam TCTH de doador não aparentado. **Resultados:** No grupo do TMO mioablativo (n=5): houve pega em 100% dos pacientes. Um paciente apresentou recaída. Três pacientes apresentaram DECH-A II-IV e 4 pacientes evoluíram com DECH crônico extenso grave. Quatro dos cinco pacientes foram a óbito. A única paciente viva tinha 10 anos de idade a época do transplante. A sobrevida mediana foi de 479 dias. No grupo do RIC (n=9): houve falha de pega em 1 paciente que recebeu medula de doador não aparentado e apresentada esplenomegalia de 18 cm no momento do transplante. Três de nove pacientes recaíram. Sete dos nove pacientes permanecem vivos, com sobrevida mediana de 750 dias (34-1872). p= 0,000123, **Conclusão:** A despeito da pequena amostragem os dados sugerem que a utilização de regimes de intensidade reduzida parece permitir melhor taxa de sobrevida, apesar da maior taxa de recaída.

1214

### Laboratório de processamento de Células Progenitoras Hematopoéticas: experiência de oito meses da Clínica De Hemoterapia Ltda

Silva GA<sup>1</sup>, Azevedo JP<sup>1</sup>, Saldanha JJ<sup>1</sup>, Corrêa MR<sup>2</sup>, Ribeiro CH<sup>1</sup>, Finkel CM<sup>1</sup>, Lisboa MM<sup>1</sup>, Silva AA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Clínica de Hemoterapia LTDA

<sup>2</sup> Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói, RJ

A demanda de transplantes autólogos de Células Progenitoras Hematopoéticas (CPH) é crescente no serviço privado, e hoje ela é responsável por aproximadamente metade destes transplantes realizados no Estado. Por este motivo, a Clínica de Hemoterapia LTDA (Niterói - RJ) implantou um Laboratório de Processamento de Células Progenitoras Hematopoéticas (LPCPH) em sua unidade que, desde agosto de 2011, possui licença da VISA para funcionamento. Nosso objetivo é apresentar a experiência dos primeiros

oito meses de funcionamento do LPCPH. Para a coleta das CPH, os pacientes foram mobilizados com fator de crescimento G-CSF, precedidos ou não de quimioterapia. As coletas por aférese foram iniciadas no primeiro dia em que os pacientes apresentaram mais de 10 células CD34+/mm<sup>3</sup> no sangue periférico. Foram colhidas, em média, quatro volemias por aférese para mononucleares em Cobe Spectra. Os produtos foram heparinizados e refrigerados a 4°C por no máximo 24 horas até a criopreservação. A quantificação de leucócitos foi realizada em contador automático Coulter T890. Utilizamos solução crioprotetora composta de hidroxietilamido (HES) a 5,83%, albumina humana (AH) a 4% e DMSO a 5% do volume final, e as suspensões contendo 50% de células em plasma autólogo e 50% de solução de criopreservação foram divididas em frações de 60 a 115mL, com concentração celular alvo de 2,0x10<sup>8</sup>/mL de leucócitos totais. Estas frações foram acondicionadas em estojos de alumínio para congelamento mecânico em freezer a -86°C e mantidas armazenadas à mesma temperatura até a data do transplante. A viabilidade celular foi definida por microscopia ótica e exclusão por azul de trypan. Para quantificação de CPH utilizamos citometria de fluxo para células CD34+/CD45<sup>low</sup>, segundo metodologia definida por ISHAGE, em citômetro CyAN da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense. Realizamos ensaio clonogênico com sistema MACS<sup>®</sup> Media de cultura em metilcelulose com fatores recombinantes para crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC-GM), que foram contadas em microscópio invertido 14 a 16 dias após a incubação. No período de dezembro de 2011 a julho de 2012 foram atendidos 34 pacientes com mediana de idade de 45 anos (3 pacientes pediátricos e 31 adultos), que realizaram 35 mobilizações (11 com quimioterapia e 24 sem) e um total de 49 aféreses. A média de CPH circulantes antes da primeira aférese foi de 39 CD34<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>(4-410), com média de 4,27x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/Kg (0,62-40,44) colhidas em cada aférese. Os produtos congelados apresentaram concentração celular média de 1,94x10<sup>8</sup>/mL (1,18-2,11), com recuperação de 107% (77-165) no descongelamento. Os produtos apresentaram viabilidade celular >99% antes da criopreservação, e recuperaram em média 87% (68-97) da viabilidade e 95,7% (12,6-330,7) das UFC-GM no descongelamento. Houve correlação (R= 0,8790, p < 0,0001) entre as células CD34<sup>+</sup> plaqueadas e as UFC-GM observadas, e a relação entre elas (R CD34/UFC-GM) foi de 2,8 (0,8-9,5) na amostra fresca e 3,5 (1,2-8,8) na amostra descongelada. Foram realizados transplantes em 32 destes pacientes, com médias de 4,21x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/Kg (2,01-14,55) e 1,28x10<sup>6</sup> UFC-GM/Kg (0,32-5,88) infundidas em cada paciente. Os tempos para pega de granulócitos e plaquetas tiveram medianas de 10 (9-12) e 12 (8-18) dias respectivamente. O próximo passo para o LPCPH é a inclusão do armazenamento com nitrogênio líquido.

1215

### Different outcomes between cyclophosphamide plus horse antithymocyte globulin and cyclophosphamide plus rabbit antithymocyte globulin for HLA-identical sibling bone marrow transplantation in severe aplastic anemia

Atta EH<sup>1</sup>, Sousa AM<sup>1</sup>, Schirmer MR<sup>1</sup>, Bouzas LF<sup>1</sup>, Nucci M<sup>2</sup>, Abdelhay E<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CEMO, Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup> Hospital Universitário, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Introduction:** The standard regimen for HLA-identical sibling bone marrow transplant (BMT) in severe aplastic anemia (SAA) is cyclophosphamide (CY) and horse antithymocyte globulin (ATG). Horse ATG was replaced by rabbit ATG in many countries due to the unavailability of the former product. This study was designed to assess if these ATG preparations are interchangeable in the preparative

regimen for matched related BMT in SAA. Patients and **methods:** Forty consecutive BMT were retrospectively analyzed, 20 received CY plus horse ATG and 20 received CY plus rabbit ATG as the preparative regimen. Conditioning with CY (50 mg/kg on days -5 to -2) plus horse ATG (Lymphoglobulin® 30 mg/kg on days -5 to -3) was performed from June 1995 to October 2004. Due to the unavailability of the horse preparation in Brazil, rabbit ATG (Thymoglobulin® 2 mg/kg on days -4 to -1) plus CY at the same dose became the preparative regimen since November 2004. **Results:** The day +100 probability of acute GVHD grades II-IV was 35.2% (95% confidence interval [CI] 13.8%-57.7%) and 0% (95% CI n/a) in patients receiving horse ATG and rabbit ATG, respectively (p=0.009). The three-year cumulative incidence of moderate-severe chronic GVHD was 34% (95% CI 11.5%-58.2%) and 0% (95% CI n/a) in recipients of horse and rabbit ATG, respectively (p=0.04). The day +100 probability of proven/probable invasive fungal disease was higher in patients conditioned with rabbit ATG, 31.2% (95% CI 12.1%-52.7%) vs. 5.5% (95% CI 0.3%-23.0%), respectively (p=0.04). The day +100 cumulative incidence of CMV reactivation was similar between recipients of horse and rabbit ATG, 76.4% (95% CI 46.0%-91.1%) and 76.4% (95% CI 46.0%-91.1%), respectively (p=0.36). However, the median time from BMT to CMV reactivation was shorter in recipients of rabbit ATG (40 vs. 50 days, p=0.02). An inferior lymphocyte count on days +30 (0.360 vs. 0.814 x 10<sup>9</sup>/L, p=0.01) and +90 (0.744 vs. 1.330 x 10<sup>9</sup>/L, p=0.006) was noticed in recipients of rabbit ATG. Chimerism assessment was available in 26 out of the 30 patients surviving beyond day +100 (86.7%). The distributions of full donor, transient mixed, and stable mixed chimerism was different between patients conditioned with horse ATG (81.8%, 0%, and 18.2%, respectively) and rabbit ATG (13.3%, 6.7%, and 80%, respectively) (p=0.002). A trend toward an inferior ALC was observed in patients with mixed chimerism in comparison with those with full donor chimerism on days +30 (0.478 vs. 0.770 x 10<sup>9</sup>/L, p=0.07), +60 (0.745 vs. 1.031 x 10<sup>9</sup>/L, p=0.03), and +90 (0.809 vs. 1.270 x 10<sup>9</sup>/L, p=0.07). Only two cases of graft rejection were noticed, one primary graft rejection in the rabbit ATG group and one secondary graft rejection in the horse ATG group. The one-year survival was similar between the two regimens, 65% in the CY plus horse ATG group and 63.3% in the CY plus rabbit ATG group (p=0.87). The main cause of death was GVHD-related complications in recipients of horse ATG (four out of ten) and infectious-related in recipients of rabbit ATG (four out of eight). **Conclusion:** Our results suggest that horse and rabbit ATG preparations have different biological and clinical properties and should not be used interchangeably in the preparative regimen of sibling BMT in SAA.

## 1216

### Análise de óbitos por causas específicas em anemia aplásica pós-TMO: modelos de riscos competitivos

Sousa AM<sup>1</sup>, Atta EH<sup>1</sup>, Moreira MC<sup>1</sup>, Pacheco AG<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CEMO, Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup> Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** A anemia aplásica (AA) é uma doença rara, potencialmente curável com o transplante de medula óssea (TMO). A análise de fatores prognósticos pode melhorar os Resultados dessa terapia. **Métodos:** Coorte retrospectiva de pacientes com AA adquirida submetidos ao TMO em um centro de 1983 a 2010. Análises estatísticas por regressão de Cox, com variáveis tempo-dependentes e riscos competitivos. **Resultados:** Foram incluídos 126 pacientes. A idade mediana foi de 20 anos. O intervalo mediano entre diagnóstico-TMO foi de 153 dias para TMO aparentado e 1.115 dias para o não-aparentado. A sobrevida global em cinco anos foi de 52% (IC 44-62%), sendo superior para aqueles com idade <20 anos (64% versus 37%; p<0,01). As incidências de falha primária e secundária

de enxerto foram de 5,7% e 10%, respectivamente. As incidências da DECH aguda grau II-IV em 100 dias e da DECH crônica moderada-grave em 5 anos foram de 30% e 30%. As variáveis significantes para o óbito em análise univariada foram: idade >20 anos (Hazard ratio [HR] 2,1; p=0,01), período 1991-1995 (HR 3,6; p<0,01), DECH aguda (HR 2,2; p=0,02) e DECH crônica (HR 7,8; p<0,01). Na multivariada, permaneceram significantes: idade >20 anos (HR 2,4; p<0,01), período 91-95 (HR 3,5; p<0,01) e DECH crônica (HR 10,6; p<0,01). O único fator associado ao óbito por infecção foi o período 91-95 (HR 3,0; p=0,01) – ocorrência da realização de alguns transplantes fora da unidade isolada com ar filtrado. Na análise univariada, foram significantes para o óbito por DECH: intervalo diagnóstico-TMO >120 dias (HR 5,5; p=0,02) e DECH crônica (HR 3,9; p=0,015). Para óbito por DECH até o D+120 em multivariada foi significativa apenas a idade (HR 5,0; p=0,04), e a partir do D+120 foi significativa o uso de radioterapia no condicionamento (HR 8,8; p=0,03). Na análise univariada, o óbito por falha secundária associou-se às seguintes variáveis: uso prévio de ATG (HR 6,0; p<0,01), doador não aparentado (HR 6,1; p<0,01), realização do TMO em 2006-2010 (HR 4,1; p<0,01), presença de DECH aguda (HR 0,2; p=0,05) e DECH crônica (HR 0,1; p=0,04). No modelo multivariado, foram significantes o ano do TMO 06-10 (HR 5,3; p<0,01) e a profilaxia contra a DECH diferente de CsA+MTX (HR 3,79; p=0,007). **Conclusões:** A análise de sobrevida através de técnicas estatísticas mais apuradas, além de reduzir o risco de envolvimento estatístico, leva a melhor identificação de variáveis que influenciam a mortalidade por causas específicas e poucos estudos com este tipo de abordagem foram publicados até o momento em portadores de AA submetidos a TMO. Em nosso estudo, a idade >20 anos e a ocorrência da DECH crônica associaram-se de forma independente à mortalidade global. O uso de radioterapia no condicionamento e a idade >20 anos associaram-se independentemente ao óbito por DECH. A realização do TMO após 2006 e o tipo de profilaxia contra DECH associaram-se independentemente ao óbito por falha secundária de enxerto. A partir desses Resultados, levantamos algumas hipóteses que poderão ser testadas futuramente e recomendamos as seguintes estratégias: modificar o regime de condicionamento para pacientes com idade >20 anos, adotar medidas para reduzir a ocorrência da DECH crônica, não utilizar radioterapia no condicionamento, evitar o uso prévio do ATG nos candidatos ao TMO aparentado e utilizar CsA+MTX para profilaxia da DECH.

## 1217

### Alterações nos parâmetros do hemograma de pacientes submetidos à leucaférese para coleta de células progenitoras hematopoiéticas e sua influência na eficiência da coleta

Beheregaray AP<sup>1</sup>, Diniz VL<sup>2</sup>, Nogueira CM<sup>2</sup>, Gusmão N<sup>1</sup>, Silva GA<sup>1</sup>, Lacativa CP<sup>2</sup>, Silva AM<sup>1</sup>, Borojevic R<sup>3</sup>, Maiolino A<sup>1</sup>, Rossi MI<sup>3</sup>, Dutra HS<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Hematologia, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - HUCFF, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup> Serviço de Hemoterapia, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - HUCFF, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

<sup>3</sup> Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

A coleta de células progenitoras hematopoiéticas do sangue periférico no transplante autólogo requer processamento do sangue através de leucaféreses. O produto final a ser transplantado sofre influência de vários fatores como: qualidade e quantidade de células circulantes, número de volemias processadas, equipamento utilizado e protocolo instituído. A quantidade e pureza das células mononucleares ou células progenitoras no produto expressam a

eficiência deste procedimento. Nosso objetivo foi analisar as alterações ocorridas, após os procedimentos de aférese, nos parâmetros do hemograma e na contagem de células CD34<sup>+</sup>, bem como os fatores capazes de influenciar a eficiência da coleta das células progenitoras hematopoéticas. **Métodos:** Foram analisados os dados em 27 procedimentos de aférese de 17 pacientes (9F/8M) com idade média de 48 anos (33-65), peso médio de 71 Kg (47-116), no período de setembro de 2011 a março de 2012. A distribuição destes pacientes por diagnóstico foi de: Mieloma Múltiplo 76%, Linfoma de Hodgkin 18% e Linfoma não-Hodgkin 6%. Os regimes de mobilização aplicados foram: G-CSF 71%, Ciclofosfamida/G-CSF 23% e Vepeside/G-CSF 6%. As aférese foram realizadas no equipamento CobeSpectra®. Foram processados em média 17339 mL (12005-25500). Os hemogramas foram realizados em um contador automático Beckman-Coulter LH 750 e o total de células CD34<sup>+</sup> foi determinado nas amostras pré-aférese, pós-aférese e no produto da leucaférese (protocolo ISHAGE). A eficiência de coleta (EC) foi calculada através da fórmula  $EC(\%) = CD34^+ \text{ produto} \times 100 / (CD34^+ \text{ pré} \times CD34^+ \text{ pós}) / 2 \times (\text{Volemia processada} - \text{Volume de anticoagulante})$ . Para análise estatística foram usados os Métodos de Mann-Whitney e Spearman. **Resultados:** A leucometria dos pacientes após a aférese apresentou redução média de 18% (3,4-43,6%). A concentração da hemoglobina e das plaquetas diminuiu em média 9% (0-20,5) e 52% (31,6-70,9), respectivamente. A quantidade de células CD34<sup>+</sup> após a aférese apresentou uma taxa de redução média de 54,7% (34,5-70,6) e uma eficiência de coleta entre 14 e 158% (média=55). Nenhum dos parâmetros descritos acima teve influência na eficiência da coleta de células CD34<sup>+</sup> ( $p > 0,05$ ), nem mesmo a leucometria ou a taxa de hemoglobina. Foi observado, no entanto, que a eficiência da coleta correlacionou-se inversamente com a quantidade de células CD34<sup>+</sup> no sangue periférico antes da aférese ( $p < 0,05$ ). A taxa média de mononucleares e de hemoglobina nos produtos foi de 84% (64- 98) e 0,9 g/dL (0,1-2,1), respectivamente. **Conclusões:** Entre os parâmetros do hemograma analisados observamos que as plaquetas tiveram uma maior taxa de redução após aférese. Esta redução foi semelhante à redução das células progenitoras. A eficiência da coleta de células progenitoras sofreu uma grande variação, não apresentando correlação com a leucometria, com a concentração de hemoglobina ou com as taxas de redução nos parâmetros avaliados. A eficiência da coleta foi maior em pacientes com menor quantidade de células CD34<sup>+</sup> antes da aférese. Um estudo da dinâmica de circulação e distribuição das células progenitoras hematopoéticas poderá contribuir na compreensão da eficiência de coleta destas células.

## 1218

### Relato de experiência de uma oficina na sbpc jovem sobre doação de medula óssea: formação agentes multiplicadores

Oliveira RC, Aguiar VP, Silva DV, Abreu KC, Araújo IM, Dumont SV, Cunha VB, Nicolau DI

Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luis, MA

**Introdução:** A medula óssea (MO), tecido que ocupa o interior dos ossos e origina hemácias, leucócitos e plaquetas. Muitas doenças hematológicas, como a leucemia e a mielodisplasia necessitam do transplante de medula óssea, como modalidade terapêutica, em última instância. O transplante de MO é a transferência de células tronco hematopoéticas do doador para o receptor, por via endovenosa em um aspirado de células que migram pelo sangue até se fixarem na MO do receptor e voltarem a se multiplicar e cumprir suas funções fisiológicas. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que em 2010 foram quase 6 mil mortes no país por leucemias e a estimativa para 2012 é de 8.510 casos. As chances de um indivíduo encontrar um doador entre irmãos é de apenas 25% e nos últimos 10 anos a chance de se encontrar um doador com-

patível no banco de registro aumentou para 64%, o que mostra a importância de um banco de voluntários. **Objetivos:** Relatar a experiência de uma liga acadêmica de hematologia e hemoterapia, com uma oficina sobre doação de medula óssea no evento da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC)-SBPC Jovem, que objetivou estimular voluntários para o cadastro no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME). **Relato:** A oficina foi direcionada a estudantes, jovens e adultos. A duração foi de 3 horas, dividida em 4 momentos: o 1º com aplicação de um pré-teste, com perguntas objetivas sobre a temática para avaliar o conhecimento prévio dos participantes; o 2º com palestra sobre o transplante de medula óssea; o 3º divisão em pequenos grupos para Discussão de caso; o 4º com aplicação do mesmo questionário para avaliar se houve êxito na compreensão do tema. O teste era composto de três partes: os conhecimentos da função da medula óssea, o processo de doação e a recuperação dos envolvidos no transplante. A palestra e o teste foram montados baseados nos relatos de experiência de outras equipes, buscando contemplar nos mesmos uma gama de informações que suprisse todas as dúvidas dos observadores, com linguagem acessível e de forma dinâmica. Avaliou-se comparativamente o percentual de acertos dos testes aplicados antes e após a palestras, analisando a metodologia da palestra aplicada e sua validade. **Resultados:** A oficina teve a participação de 20 pessoas, com faixa etária de 16 a 30 anos. Com média de idade de 19 anos. Dos testes analisados, 38,89% eram compostos de homens. Na primeira parte do questionário, 78% dos participantes acertaram antes da apresentação, enquanto após o resultado foi de 97%. Na segunda parte, o percentual de acertos foi de 70% antes e 92% após. Na última parte, foram obtidos 51% no início e 74,5% no final. **Conclusão:** Houve nítida evolução nos conhecimentos dos principais temas relacionados ao transplante de MO. Diante do maior conhecimento referente ao tema, espera-se que a população sinta-se incentivada a buscar o hemocentro de sua localidade, se cadastrar no REDOME e propagar as informações adquiridas. Aumentando assim a possibilidade de encontrar um doador compatível impactando significativamente na cura de pacientes com doenças hematológicas.

## 1219

### O uso de Busulfan e Ciclofosfamida em crianças e adolescentes portadores de anemia aplásica severa, submetidos a um transplante de medula óssea aparentado compatível em duas grandes instituições

Bonfim C<sup>1</sup>, Mauad M<sup>2</sup>, Loth G<sup>1</sup>, Ribeiro L<sup>1</sup>, Bitencourt MA<sup>1</sup>, Souza MP<sup>2</sup>, Medeiros LA<sup>1</sup>, Oliveira MM<sup>1</sup>, Colturato V<sup>2</sup>, Pasquini R<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP

**Introdução:** O transplante de medula óssea (TMO) é o tratamento de escolha para pts portadores de Anemia Aplásica Severa que tenham irmãos compatíveis. Infelizmente, muitos pts ainda chegam aos centros de transplante politransfundidos aumentando o risco de rejeição e diminuindo as chances de sobrevida. Em 1993, devido a indisponibilidade da Globulina anti timocítica, o Busulfan foi acrescentado a ciclofosfamida com a finalidade de diminuir a incidência de rejeição e melhorar a sobrevida destes pts. **Objetivo:** Analisar a sobrevida de crianças e adolescentes portadores de AAS e submetidos a um TMO aparentado compatível em duas instituições. **Métodos:** Análise retrospectiva do banco de dados de 99 pts transplantados no Serviço de TMO do HC –UFPR (83pts) e Hospital Amaral Carvalho, Jaú (16pts). Período: 1993- 1997: 37pts; 1998-2002: 27pts e 2003 a 2010: 35pts. Foram analisados o gênero, a idade, pega do enxerto, presença ou não de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e crônica, complicações e sobrevidaglobal. **Resultados:** A idade variou de 2 a 18 anos (M: 12 anos) e 63pts eram do sexo masculino. Todos foram submetidos a um TMO aparentado com-

patível utilizando o mesmo esquema de condicionamento com Busulfan 12mg/kg + Ciclofosfamida 120 mg/kg e imunoprofilaxia com ciclosporina e metotrexate. Todos os pts haviam recebido 15 ou mais transfusões de hemoderivados e no STMO HC-UFPR a mediana de transfusões foi de 28 U(15 – 151). 95pts viveram mais de 28 dias e foram avaliáveis para a pega. Destes, 2 pts apresentaram uma falha primária de pega e ambos morreram enquanto 17pts tiveram uma rejeição tardia entre 218 a 4038 dias pós TCTH(M: 685 dias). A incidência cumulativa(IC) de rejeição foi de 20%. Pts < 11 anos apresentaram uma IC de rejeição de 33% enquanto que os pts mais velhos apresentaram 13% (p=0,05). Observou-se uma diminuição na rejeição nos últimos 8 anos (7%) quando comparado ao período de 1998 a 2002: 31% (p=0,02). 12/76 pts avaliáveis apresentaram DECH- aguda grau II a IV e a SG neste grupo foi muito pior do que a SG nos pts sem DECH agudo (86 x 33% p< 0,001). Nove dos 73 pts avaliáveis desenvolveram DECH crônica limitada ou extensa e a SG também foi significativamente inferior. 29 pts morreram entre 15 e 1455 dias pós TMO e as infecções bacterianas e fúngicas foram as maiores causas de óbito neste grupo. A mortalidade relacionada ao procedimento em 100 dias foi de 14% e também não variou de acordo com o tempo. Setenta pts estão vivos e bem entre 486 a 7007 dias pós TMO (M: 3900) com uma SG de 71% em 5 anos. Não houve diferença na SG de pts abaixo ou acima de 11 anos de idade ou entre os períodos de tempo analisados. **Conclusões:** O uso de Busulfan e ciclofosfamida foi bem tolerado e proporcionou uma boa sobrevida para as crianças e adolescentes portadores de AAS politranfundida. Apesar da rejeição ter diminuído consideravelmente nos últimos anos, não houve ainda um aumento significativo na sobrevida global.

## 1220

### Transplante de sangue de cordão umbilical não aparentado em 40 pacientes com anemia de fanconi

Demeneck H<sup>1</sup>, Ribeiro LL<sup>2</sup>, Grasselli V<sup>1</sup>, Pilonetto D<sup>2</sup>, Koliski A<sup>2</sup>, Bitencourt MA<sup>2</sup>, Cardoso GR<sup>3</sup>, Emlund-Pangrácio L<sup>4</sup>, Pasquini R<sup>2</sup>, Bonfim CM<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Liga Acadêmica de Hematologia e Oncologia, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>3</sup> Laboratório de Criobiologia – Biobanco, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>4</sup> Busca de Doador Não Aparentado, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introdução:** A anemia de fanconi (AF) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por anomalias congênitas, falência medular progressiva e alto risco de desenvolvimento de malignidades, especialmente LMA e certos tumores sólidos. O TCTH é a única opção curativa para as manifestações hematológicas desta doença, sendo o Transplante de sangue de cordão umbilical não aparentado (TSCU NAP) uma alternativa para pacientes (pts) que não possuem doador de medula óssea compatível. **Métodos:** Seleção de 40 pts com AF submetidos a TSCU NAP entre 04/2000 e 10/2009, seguindo análise retrospectiva de dados. **Resultados:** Idade ao TCTH: 3 a 18 anos (M: 8 anos). Sexo: 27F/13M. Transfusões prévias: 1-101 unidades (Mediana: 15 U). Compatibilidade: 6/6: 6pts; 5/6: 19pts e 4/6: 16pts. Regimes de condicionamento: ciclofosfamida(CFA) + Fludara + ATG: 31pts; CFA: 4pts; CFA + Fludara: 3pts; Fludara + TBI 2pts. Número total de células pré-descongelamento: 2,43 a 18,62 x 10<sup>7</sup>/kg (M: 6,2) e pós-descongelamento: 2 a 13,6 x 10<sup>7</sup>/kg (M: 5,3). Imunoprofilaxia para DECH: Ciclosporina (csa) + corticóide: 22pts; csa + methotrexate (mtx): 16pts; csa + micofenolato mofetil: 2pts. 34pts viveram mais do que 28 dias e foram avaliados quanto à pega do enxerto. 11pts tiveram falha primária de pega (HLA 6/6: n= 1; HLA 5/6: n=5; HLA 4/6: n=5) e realizaram re-transplante, destes

apenas uma pct está viva após resgate com um TMO haploidêntico. 23/34pts avaliáveis apresentaram pega neutrofilica entre 12 e 117 dias (M: 32) e 17 pts apresentaram pega plaquetária entre 15 e 98 dias (M: 44). 23pts foram avaliáveis para DECH aguda e a incidência cumulativa (IC) de DECH graus II-IV foi de 36%. 18 pts foram avaliáveis para DECH crônica e a IC de DECH crônica em 1 ano foi de 44%. Principais complicações pós TSCU NAP: Mucosite grau II-IV (n=34), complicações infecciosas (n=34), hipertensão arterial (n=20), cistite hemorrágica (n=4) e SHU (n=1). 25 pts morreram entre 7 dias e 19 meses após TSCU NAP (M: 68 dias) sendo as complicações infecciosas (10) e a rejeição (7) as causas mais frequentes. A IC de mortalidade relacionada ao transplante aos 100 dias foi de 35% e aos 365 dias foi de 60%. Quinze pts estão vivos (HLA 6/6: n= 4; HLA 5/6: n=7; HLA 4/6: n=4) entre 2,5 e 12 anos pós TCTH (M: 8 anos) com uma sobrevida global (SG) em três anos de 37%. Na análise univariada, não houve diferença na SG em relação à idade do pt (< ou >=10 anos); DECH aguda; DECH crônica; transfusões prévias (< ou >= 15); número de células pré-descongelamento (> ou <= 6,2 x 10<sup>7</sup>/kg); compatibilidade adequada (6/6 ou 5/6 x 4/6) ou uso de mtx na profilaxia contra a DECH. A IC de rejeição em 1 ano foi de 33%. Houve uma tendência de maior falha de pega nos pts que receberam mtx (48% x 18% p=0,08). **Conclusão:** Neste estudo, a sobrevida pós TSCU em pts com AF foi de apenas 37%. Apesar do pequeno número de pts, esta é uma das maiores casuísticas do mundo e os Resultados diferem drasticamente daqueles observados quando utilizamos medula óssea de doador não aparentado compatível. O TSCU em pts com AF deve ser feito com cautela e em centros especializados devido à alta taxa de mortalidade relacionada ao procedimento.

## 1221

### Transplante de células tronco hematopoiéticas em 14 pacientes com adrenoleucodistrofia: experiência de Curitiba

Scherer D<sup>1</sup>, Demeneck H<sup>1</sup>, Loth G<sup>2</sup>, Ribeiro LL<sup>2</sup>, Koliski A<sup>2</sup>, Nichele S<sup>1</sup>, Teive H<sup>2</sup>, Ono S<sup>2</sup>, Malvezzi M<sup>2</sup>, Bonfim CM<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Liga Acadêmica de Hematologia e Oncologia, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR.

<sup>2</sup> Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introdução:** A adrenoleucodistrofia (ALD) é uma doença peroxissomal ligada ao cromossomo X que ocasiona acúmulo de ácidos graxos saturados de cadeia longa no plasma, cérebro e córtex adrenal. Manifesta-se como uma doença degenerativa grave com distúrbios visuais e auditivos, insuficiência adrenal e desmielinização multifocal do sistema nervoso central com progressão rápida e evolução fatal geralmente ao redor de 5 anos após surgimento dos sintomas. O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é indicado apenas para os pts com envolvimento cerebral e, quando realizado precocemente, pode melhorar significativamente a sobrevida a longo prazo e estabilizar a doença. **Métodos:** Revisão retrospectiva dos prontuários médicos de 14 pacientes (pts) do sexo masculino com ALD submetidos à TCTH entre 06/2000 e 05/2011. **Resultados:** Idade ao TCTH: 4 a 19 anos (M: 10). Duração da doença ao TCTH: 3 a 52 meses (M: 29). Quatro pts apresentavam evidências clínicas de disfunção neurológica pré-transplante. Oito pts foram previamente tratados com óleo de Lorenzo (n=6) e/ou corticoides (n=4). Três pts receberam medula óssea de doadores aparentados (HLA 10/10: 1; HLA 9/10: 2) e os demais pacientes foram submetidos à TCTH não aparentado (NAP), sendo que oito receberam MO (HLA 10/10: 3; HLA 9/10: 4; HLA 8/10: 1) e três receberam SCU (HLA 6/6: 1; HLA 4/6: 2). Regime de condicionamento com Busulfan + Ciclofosfamida ±ATG foi realizado na maioria dos pts (n=11). O número de células infundidas nos TSCU variou de 4,3 a 9,94 x 10<sup>7</sup>/kg (M: 5,1) e no TMO variou de 2,17 a 7,35 x 10<sup>8</sup>/kg (M: 3,42). Todos os



pts receberam Ciclosporina como imunoprofilaxia para doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), que foi utilizada sozinha (n=1), associada ao Methotrexate (n=11) ou a corticoide (n=2). Todos os pts viveram mais do que 28 dias e foram avaliados quanto à pega do enxerto. Dentre os 3 pts submetidos a TSCU, dois apresentaram falha primária de pega do enxerto e evoluíram para óbito e um apresentou pega parcial e morreu no D+30 por pneumonia sem atingir recuperação plaquetária. Todos os outros pts apresentaram pega completa do enxerto e a mediana para recuperação neutrofílica foi de 22 dias (16-53 dias) e para recuperação plaquetária foi de 25 dias (9-42 dias). Principais complicações pós TCTH: Mucosite grau II-IV (n=10); infecções (n=9), hipertensão arterial (n=6), complicações neurológicas (n=4) e cistite hemorrágica (n=1). DECH aguda grau II-IV ocorreu em 4/14 pts avaliáveis, enquanto DECH crônica ocorreu em 3/13 pts avaliáveis. Seis pts foram a óbito entre 30 e 1350 dias pós TCTH (M: 467) devido à rejeição (n=2), progressão da doença de base (n=2), DECH crônica (n=1) e complicação infecciosa (n=1). Os outros oito pts estão vivos entre 1 e 10,5 anos pós TCTH (M: 4 anos) com uma sobrevida global em três anos de 54% (75% para pts com doença precoce x 25% para pts com doença avançada). Destes, um paciente apresenta progressão lenta e significativa da doença e os demais estão assintomáticos pós TCTH. **Conclusão:** A progressão da disfunção neurológica em pts com ALD submetidos a TCTH depende, em grande parte, do *status* clínico neurológico antes do procedimento. O TCTH demonstra benefício a longo prazo, principalmente quando realizado precocemente no curso da doença. O diagnóstico precoce e o encaminhamento rápido para um centro de transplante são essenciais para o sucesso deste procedimento.

1222

### Transplante de células tronco hematopoiéticas em 12 pacientes com mucopolissacaridose: experiência de uma única instituição

Silva GF<sup>1</sup>, Demeneck H<sup>1</sup>, Koliski A<sup>2</sup>, Mousquer RT<sup>2</sup>, Ribeiro LL<sup>2</sup>, Loth G<sup>2</sup>, Marinho DH<sup>2</sup>, Fabricio V<sup>2</sup>, Malvezzi M<sup>2</sup>, Bonfim CM<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Liga Acadêmica de Hematologia e Oncologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introdução:** As mucopolissacaridose (MPS) são doenças metabólicas hereditárias, que resultam em acúmulo de glicosaminoglicanos. As principais manifestações da doença incluem retardo mental, disfunção motora e alterações cardíacas e oftalmológicas. O tratamento pode ser realizado com terapia de reposição enzimática, porém a correção definitiva da deficiência só é atingida com o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), que representa possibilidade de evolução favorável a longo prazo e prolongamento da sobrevida. Atualmente o TCTH é indicado para os pacientes (pts) portadores da forma grave da MPS tipo I (Síndrome de Hurler), porém alguns pts selecionados portadores de MPS II (Hunter) e MPS VI podem também se beneficiar deste procedimento. **Métodos:** Seleção de 12 pts com MPS submetidos a TCTH alogênico entre 03/1988 e 05/2011, seguindo análise retrospectiva de dados. **Resultados:** Idade dos pts na época do TCTH: 1 a 10 anos (M: 4). Sexo: 5F/7M. **Diagnóstico:** MPS tipo I (n=5), tipo II (n=3), tipo IIIB (n=1), tipo IV (n=1) e tipo VI (n=2). Pré-TCTH, apenas 2 pts receberam terapia de reposição enzimática (MPS tipo II). Cinco pts (41,6%) receberam medula óssea de doadores aparentados totalmente compatíveis (TMO AP) e sete pts realizaram TCTH NAP, 4 com sangue de cordão umbilical (SCU) e 3 com medula óssea (MO). Todos os pts foram condicionados com Bussulfan+ ciclofosfamida +/- ATG. O número de células infundidas no TSCU variou de 7,89 a 10,5 x 10<sup>7</sup>/kg (M: 9,41) e no TMO variou de 3,24 a 10,78 x 10<sup>9</sup>/kg (M: 6,11). Todos os pts receberam Ciclosporina como imunoprofilaxia para

doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), associada a Methotrexate (n=8) ou a corticoide (n=4). Todos os pts viveram mais do que 28 dias e foram avaliados quanto à pega do enxerto. Um pct apresentou falha primária de pega (TSCU NAP), recebeu um segundo transplante e morreu e um pct (TMO NAP) apresentou pega parcial, evoluindo para óbito no D+37 por DECH aguda sem atingir recuperação plaquetária. Os demais pts (n=10) apresentaram pega completa, porém um deles (TMO AP) desenvolveu rejeição tardia no D+91. A mediana para recuperação neutrofílica foi de 25 dias (12-30) e para recuperação plaquetária foi de 31 dias (22-52). Mucosite grau II-IV ocorreu em 8 pts, não tendo ocorrido nenhum episódio de VOD ou cistite hemorrágica. DECH aguda grau IV ocorreu em 4/11 pts avaliáveis e DECH crônica ocorreu em 1/9 pts avaliáveis. Seis pts foram a óbito (TMO NAP: 3; TMO AP: 1; TSCU NAP: 2) entre 37 e 288 dias pós TCTH (M: 127) devido à rejeição (n=1), DECH aguda (n=3), infecção por *Aspergillus sp* e abscesso cerebral (n=1) e pneumonite intersticial viral (n=1). Os outros seis pts estão vivos (TMO AP: 4 e TSCU NAP: 2) entre 4 meses a 20 anos pós TCTH (M: 2 anos) com uma sobrevida global em três anos de 50%. Destes, 3 pts transplantados com doadores heterozigotos apresentaram progressão lenta da doença e os demais estão bem e evoluem sem complicações neurológicas pós TCTH. **Conclusão:** A MPS é uma doença de acúmulo rara e o TCTH pode ser uma opção terapêutica principalmente para os pts portadores de MPS I. A DECH aguda e crônica ainda foi responsável por grande parte dos óbitos. Nesta casuística muitos pts foram encaminhados com doença avançada com comprometimento neurológico. O diagnóstico precoce e o encaminhamento para um centro de transplante especializado são essenciais para o sucesso deste procedimento.

1223

### Transplante de medula óssea alogênico para porfiria eritropoiética congênita

Almeida AM<sup>1</sup>, Perini GF<sup>1</sup>, Fernandes JF<sup>1</sup>, Sousa AM<sup>2</sup>, Macedo EM<sup>1</sup>, Santos FN<sup>1</sup>, Bautzer VR<sup>1</sup>, Souza CL<sup>1</sup>, Kerbauy FR<sup>1</sup>, Ribeiro AA<sup>1</sup>, Hamerschlag N<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

<sup>2</sup> Serviço de Hematologia Pediátrica, Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira - IPPMG Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** A Porfiria Eritropoiética Congênita (PEC), ou doença de Gunther, é um distúrbio autossômico recessivo raro do metabolismo das porfirinas, que consiste na deficiência do uroporfirínogênio cosintetase. A deficiência dessa enzima resulta no acúmulo de quantidades elevadas de uroporfirina I em todos os tecidos, levando a anemia hemolítica, esplenomegalia, eritrodontia, fragilidade óssea e lesões de pele. O tratamento consiste de proteção contra exposição à radiação ultravioleta, cuidados com a pele e suporte transfusional. Em casos severos, o transplante de medula óssea é um procedimento curativo resultando em melhora da fotossensibilidade e dos níveis de porfirina. **Relato de Caso:** Nós relatamos o caso de uma paciente com história de icterícia neonatal, a qual foi tratada com sessões de fototerapia. Durante o tratamento houve aparecimento de lesões cutâneas graves em todo o tronco secundárias a fotossensibilidade, passando posteriormente a ter necessidade de internações de repetição para tratamento das lesões e suporte transfusional. Foi realizado o diagnóstico de PEC somente aos 9 meses de idade, devido a lesões cutâneas, fraturas ósseas e elevação de porfirinas no sangue (Porfirina totais= 7.394mcg/dL, Ref= 20-80; uroporfirina= 50%; Coproporfirina= 47%) e urina (Porfirinas totais= 16.303 nmol/L; uroporfirina= 21%; Coproporfirina= 22%). Realizou esplenectomia, com melhora parcial da necessidade transfusional, passando a usar hidroxiuréia após a cirurgia; possuía ainda passado de Acidente Vascular Encefálico Isquêmico em dezembro de 2010. Foi submetida com 04 anos de idade ao Transplante de

Células Tronco Hematopoiética (TCTH) Alogênico não aparentado totalmente compatível (Total de Células Nucleadas= 24,83 x 10e8/kg; CD34= 8,8 x10e6/kg), após condicionamento com Bussulfano + Ciclofosfamida + Timoglobulina. Realizou profilaxia para Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) com associação de ciclosporina e micofenolato mofetil. Apresentou pega neutrofílica no D+11, tendo quadro de choque séptico com necessidade de uso de droga vasoativa e ventilação mecânica 72 horas antes da recuperação neutrofílica. Curso com melhora após suporte clínico com antibioticoterapia de largo espectro. Evoluiu com DECH intestinal (grau IV clínico; grau II/III histopatológico), sendo introduzido corticoterapia sistêmica e tópica sem resposta satisfatória, e posteriormente realizado infusão de células mesenquimais e etarnecept, com resposta. Evoluiu com melhora do quadro cutâneo após o transplante. Nova avaliação laboratorial realizada após 3 meses de TCTH demonstrou níveis ainda elevados, porém em diminuição, de porfirinas urinária e sérica. A paciente evoluiu para óbito no quarto mês pós-TCTH por provável choque séptico. **Conclusão:** Nós descrevemos o primeiro caso de PEC que foi submetido à transplante de medula óssea alogênico não aparentado do país. Vale ressaltar a necessidade de investigação de porfíria em recém-natos com toxicidade grave a fototerapia, para reduzir o risco de sequelas cutâneas.

## 1224

### Estudo comparativo entre a validação das técnicas automatizadas dos equipamentos SEPAX e AXP no processamento de células hematopoética no sangue de cordão umbilical e placentário

Mazieiro DA, Alvarez KC, Oliveira DC, Araujo IC, Coesanti MV, Camillo ZM, Campos TC, Cardoso PN, Kondo AT, Sakashita AM, Kutner JM

Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

**Introdução:** Visando maior inovação tecnológica e garantia da qualidade para processamento de unidades de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (SCUP), novos Métodos de automação devem ser avaliados, validados e se aplicável, implementados na rotina. Atualmente 2 técnicas automatizadas estão disponíveis no mercado, AXP e Sepax. **Objetivo:** Validar comparativamente as duas técnicas automatizadas para o processamento de SCUP, comparando os seguintes parâmetros: recuperação pós processamento, cultura microbiológica, viabilidade celular por *Trypan Blue* (TB) e por Citometria de Fluxo (CF). **Métodos:** Foram utilizadas 11 unidades de SCUP, coletadas no período 02/2012 a 06/2012 para técnica do AXP, bolsa de congelamento *Pall* e 11 unidades para o Sepax, bolsa de congelamento *Biosafe*. De acordo com volume de cada unidade foi adicionado 20% de plasmin e as mesmas foram homogeneizadas por 5 minutos. Cada unidade foi processada de acordo com a orientação de seus respectivos fornecedores. Para a técnica do AXP foram selecionadas unidades com até 170mL de SCUP e para o Sepax não houve restrição de volume. **Resultados:** As técnicas avaliadas obtiveram média de recuperação pós processamento de 93% (85-99) no AXP e 83% (64-100) no Sepax,  $p < 0,05$ . As unidades processadas no Sepax com  $TCN > 150 \times 10^7$ ,  $n=3$ , obtiveram recuperação de 68%, retirando estas amostras da 1ª análise temos recuperação das demais unidades de 89%. A viabilidade celular por TB e CF foi de respectivamente foi de 98% e 93% no AXP e 98% e 92% no Sepax. Todas as culturas microbiológicas apresentaram resultado negativo. **Conclusão:** Não houve diferença significativa entre as duas técnicas analisadas quanto a cultura e viabilidade por *Trypan Blue* e citometria de fluxo. A recuperação celular pós processamento foi superior no equipamento AXP quando comparado a Sepax ( $p < 0,05$ ). Para melhor desempenho dos equipamentos foi mantido para o AXP unidades com até 170 mL de SCUP e para o Sepax foi determinado unidades com até 150 mL de volume e TCN

até  $150 \times 10^7$ . Para ambas as técnicas, foi padronizado 15 minutos de homogeneização após a adição do plasmin e uma nova análise desta estratégia deve ser realizada para mensurar a eficácia desta medida. O nosso departamento padronizou as 2 técnicas em sua rotina, como medida de qualidade e método de backup.

## 1225

### Transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico não mieloablativo como opção terapêutica para mieloma múltiplo após falha de transplante de células tronco hematopoiéticas autólogo

Colella MP, Miranda EC, Fernandes-Júnior VC, Medina SS, Costa-Lima CS, Aranha FJ, Vigorito AC, Souza CA

Centro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, SP

**Introdução:** Mieloma Múltiplo (MM), uma neoplasia de células plasmáticas, é responsável por cerca de 10% das neoplasias hematológicas. Seu diagnóstico geralmente é precedido por um estágio denominado Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado. Segundo dados norte-americanos, possui uma incidência populacional de 4.3/100.000, sendo mais comum em negros e no sexo masculino. Sua incidência aumenta com a idade, sendo a média de idade ao diagnóstico de 67 anos. A idade tem fator decisivo no contexto do MM, já que, além de ser fator prognóstico, ela vai selecionar os pacientes aptos a receberem o tratamento de primeira linha, o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) Autólogo. Atualmente, muito discute-se sobre o manejo destes pacientes após o TCTH autólogo, principalmente sob a luz das novas drogas disponíveis, além da Discussão sobre o papel do TCTH alogênico e seu potencial curativo. **Objetivo:** Avaliar o perfil e os Resultados dos TCTH alogênicos não mieloablativos (NMA) realizados após TCTH autólogo na Enfermaria de TCTH do Hospital de Clínicas da UNICAMP. **Métodos:** Foram analisadas, retrospectivamente e a partir de dados de prontuário, as informações de 17 pacientes submetidos a TCTH alogênico NMA na Enfermaria de TCTH do Hospital de Clínicas da UNICAMP, no período de 2000 a 2010 e que estavam com resposta inferior a Remissão Parcial Muito Boa (RPMB), segundo critérios da *International Myeloma Working Group*, após o TCTH autólogo. Todos os pacientes receberam como condicionamento Irradiação Corporal Total 2 Gy e Fludarabina 60 mg/m<sup>2</sup> e como profilaxia da Doença do Enxerto contra Hospedeiro, Ciclosporina e Micofenolato Mofetil. Para o cálculo da Sobrevida Global (SG) aplicou-se o método Kaplan-Meier, considerando a data do TCTH alogênico NMA e a data de óbito e última consulta para a SG e como evento óbito por qualquer causa. Para a Sobrevida Livre de Progressão (SLP) utilizou-se a data de progressão, data de óbito por progressão ou data da última consulta. O evento utilizado foi a progressão e o óbito por progressão. **Resultados:** 17 pacientes foram avaliados, sendo 13 do sexo masculino (76,5%) com mediana de idade de 52 (36-64) anos. O *status* da doença dos 17 pacientes no momento do TCTH alogênico NMA era 14 (82,4%) em progressão e 3 (17,6%) em resposta parcial. Todos os 17 pacientes receberam Célula Tronco do Sangue Periférico como fonte de enxerto, ocorreram 4 (23,6%) casos de DECH aguda grau II-IV e 11 (64,7%) casos de DECH crônica extensa. Oito (47%) pacientes foram a óbito, sendo 3 por progressão de doença, 2 DECH crônica e o restante por infecção, DECH aguda e sangramento Sistema Nervoso Central. Atualmente, 8 casos estão em RC e apenas um em RPMB. A SG foi de 52% e a SLP foi de 42%, ambas em 120 meses. **Conclusão:** O TCTH alogênico NMA pode ser uma opção terapêutica para pacientes portadores de Mieloma Múltiplo que obtiveram resposta inferior a RPMB após o primeiro TCTH autólogo, já que pode oferecer uma melhora da resposta obtida, além de remissões duradouras. Ainda são necessários mais estudos prospectivos que confirmem o papel desta modalidade terapêutica no tratamento do Mieloma Múltiplo.

1226

### Transplante de medula óssea não aparentado em pacientes portadores de anemia aplásica severa: análise de 44 pacientes transplantados em Curitiba e Jaú

Bonfim C<sup>1</sup>, Mauad M<sup>2</sup>, Souza MP<sup>2</sup>, Ribeiro L<sup>1</sup>, Medeiros LA<sup>1</sup>, Loth G<sup>1</sup>, Bitencourt MA<sup>1</sup>, Oliveira MM<sup>1</sup>, Colturato V<sup>2</sup>, Pasquini R<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP

**Introdução:** Até recentemente, o transplante de medula óssea (TMO) não aparentado (NAP) em pacientes portadores de anemia aplásica severa (AAS) tinha um péssimo prognóstico devido ao elevado índice de rejeição e mortalidade relacionada ao procedimento. Nos últimos anos, a introdução de regimes de intensidade reduzida associado ao encaminhamento mais precoce do paciente e uso de doadores totalmente compatíveis, reduziu as complicações e aumentou a sobrevida. **Objetivo:** Analisar retrospectivamente os Resultados do TMO NAP em 44 pts portadores de AAS transplantados em duas grandes instituições. **Métodos:** Período: 1997-2012; idade: 2-36 anos (M: 15); Sexo: 14F/30M. Todos os pacientes eram politransfundidos e receberam tratamento imunossupressor prévio. Pts transplantados em Curitiba receberam entre 10 – 351 transfusões prévias (M: 101) e a duração da doença variou de 7 -192 meses (M: 20m). Fonte de células: Medula Óssea. Compatibilidade HLA: 10/10: 28pts; 9/10: 9pts ; 6/6: 7pts. Tipos de condicionamento: Intensidade reduzida: CFA+FLU+ ATG+/-TBI 200 rads: 23pts; Mieloablativos: BU12 + CFA 120 +/-ATG: 9 pts e CFA 120 + TBI altas doses +/-ATG: 12pts. Número de células infundidas: 0,9 – 11,6 x 10<sup>8</sup>/kg (M: 3,0). **Resultados:** Todos os pts viveram mais do que 28 dias e foram avaliáveis para a pega. Sete pts apresentaram falha primária de pega com uma incidência cumulativa (IC) de rejeição de 16% em 1 ano. 3/7 pts estão vivos (2 após um segundo TMO e 1 após recuperação autóloga). A IC de rejeição foi significativamente maior nos pts que receberam regimes de intensidade reduzida quando comparados com os regimes mieloablativos (32% x 0% p: 0,006). Mucosite grau III-IV: 13/44pts. DECH aguda grau II-IV ocorreu em 11/37 pts avaliáveis e a DECH crônica limitada ou extensa ocorreu em 8/31pts avaliáveis. 13 pts morreram entre 32 e 410 dias (M: 85 dias). As infecções, decorrentes ou não da rejeição foram às maiores causas de morte. A mortalidade relacionada ao procedimento aos 100 dias (42pts avaliáveis) foi de 19%. Trinta e um pts estão vivos entre 60 – 3900 dias pós TMO (M: 626 dias) com uma sobrevida global (SG) de 70% em 2 anos. A SG variou de acordo com os condicionamentos, mas não atingiu diferença estatística provavelmente pelo tamanho da amostra: CFA+TBI em altas doses: SG de 67% ; BU12+CFA+ATG: 89% e CFA+FLU+ATG+/-TBI: 64%. Pts que apresentaram falha de pega do enxerto tiveram uma tendência à SG inferior quando comparados aos pts com pega sustentada (43% x 74% p: 0,08). **Conclusões:** Neste estudo, 70% dos pts com AAS (poli transfundidos e sem resposta ao tratamento imunossupressor) estão vivos e bem após um TMO NAP. Os regimes de condicionamento de intensidade reduzida apresentaram uma maior incidência de rejeição. Apesar do pequeno número de pts e do tempo de seguimento curto, o uso de BU+CFA+ATG proporcionou uma excelente sobrevida com uma toxicidade aceitável e nenhuma rejeição. **Comentários:** Os Resultados do TMO NAP para pts com AAS melhoraram consideravelmente nestes últimos anos principalmente devido aos avanços nos cuidados suportivos, melhor escolha dos regimes de condicionamento e uso de doadores totalmente compatíveis. Estes dados sugerem que muitos pts poderiam se beneficiar deste procedimento se fossem encaminhados mais precocemente para o transplante antes da ocorrência de infecções graves e do acúmulo de ferro decorrente das transfusões.

1227

### Revisão das 98 primeiras unidades de sangue de cordão umbilical e placentário enviadas para transplante de medula óssea.

Alvarez KC, Kondo AT, Mazieiro DA, Oliveira DC, Araujo IC, Collesanti MV, Campos TC, Camillo ZM, Ribeiro AA, Sakashita AM, Kutner JM

Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

**Introdução:** O sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) pode ser uma alternativa de transplante para pacientes sem um doador compatível. Atualmente a rede Brasil Cord conta com 12 mil unidades de SCUP congeladas. Dentre as unidades congeladas e liberadas para o REDOME, 130 unidades foram identificadas e enviadas para TMO, sendo que 98 unidades saíram do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). **Objetivo:** Análise retrospectiva das 98 unidades enviadas para TMO no período de 17/07/2006 a 31/07/2012. **Métodos:** Foram analisados os critérios: Total de Células Nucleadas (TCN), Células CD34+, Raça dos Pais e Local de Coleta. **Resultados:** Atualmente o Banco de SCUP do HIAE conta com 4359 unidades liberadas para busca no REDOME. Até o momento foram identificadas e enviadas para transplante 2,3 % das unidades. Considerando as unidades enviadas para TMO, 94% foram coletadas no Hospital Albert Einstein, 4% na Maternidade M'Boi Mirim e 2% no Hospital do Campo Limpo, sendo que 89% do total são de origem branca. Todas foram processadas e congeladas no Laboratório de Células Tronco do Hospital Albert Einstein. Uma unidade foi coletada, processada e utilizada para transplante aparentado. A média do CD34+ foi de 6,71 x 10<sup>6</sup> (0,5-38,45) e do TCN foi de 162,91 x 10<sup>7</sup> (59,78-382,20), sendo 90% destas com TCN >100 x 10<sup>7</sup>. Foram transplantadas 86% das unidades enviadas, 5% das unidades aguardam o TMO e 9% não serão utilizadas. O principal motivo de não uso foi evolução da doença e óbito do paciente. **Conclusões:** Como o TMO proveniente de uma unidade de SCUP não necessita de completa compatibilidade HLA, a raça não demonstrou influência significativa na busca e solicitação das unidades. As unidades são enviadas antes do início do condicionamento do paciente. Eventualmente, ao aguardar o envio da unidade, a sua condição clínica pode não permitir o transplante. Estas unidades não podem retornar ao estoque para nova busca. As unidades mais requisitadas para envio são as que apresentam maior TCN, sendo as unidades com TCN >100 x 10<sup>7</sup> as mais procuradas. Este tipo de cordão tem maior saída para transplante incluindo TMO em adultos e custo efetivo menor.

1228

### Transplante de células tronco hematopoéticas em crianças menores de 3 anos: experiência de 10 anos do serviço de transplante de medula óssea da Universidade Federal do Paraná (STMO HC UFPR)

Koliski A<sup>1</sup>, Mousquer RT<sup>1</sup>, Marinho D<sup>1</sup>, Loth G<sup>1</sup>, Ribeiro L<sup>1</sup>, Cat I<sup>2</sup>, Nichele S<sup>1</sup>, Kuwahara C<sup>1</sup>, Pasquini R<sup>1</sup>, Bonfim C<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

<sup>2</sup> Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introdução:** A sobrevida pós transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) tem melhorado consideravelmente nos últimos anos devido aos avanços nos cuidados suportivos e melhor seleção de pts. Entretanto o TCTH para crianças muito pequenas têm complicações específicas geralmente relacionadas ao metabolismo das drogas, a doença de base e a necessidade de

cuidado intensivo. **Objetivo:** Avaliar a sobrevida de crianças menores que 3 anos de idade submetidas a um TCTH em uma única instituição nos últimos 10 anos. **Métodos:** Análise retrospectiva do banco de dados de 83 pts < 3 anos de idade transplantados entre 03/2002 a 04/2012 no STMO HC UFPR. Foram analisados o gênero, a idade, grupo de doenças, tipo de doador, fonte de células, compatibilidade, presença ou não de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda crônica, complicações e sobrevida global. Todos os pts foram acompanhados pelo grupo de intensivistas pediátricos deste serviço. **Resultados:** Das 83 crianças submetidas a um TCTH no período analisado, 63 (75,9%) eram meninos e 20 eram meninas. A mediana da idade foi 17 meses (1-33 m). Período: 2002 a 2006: 39pts e 2007 a 2012: 44pts. **Diagnóstico:** LLA: 4pts LMA: 5pts, MDS: 1pt, LMMJ: 4pts, AAS: 4pts, Anemia de Blackfan-Diamond: 1pt; Disceratose Congênita: 1pt, Imunodeficiências Congênitas: 50pts (SCID: 16 pts, Síndrome de Wiskot Aldrich: 22 pts, Linfocitose familiar: 4pts, outras imunodeficiências: 8pts), Mucopolissacaridoses: 5pts, Outras doenças metabólicas: 2 pts, Osteopetroses: 6pts. Com relação ao tipo de doador houve o predomínio do grupo não aparentado (56 pts) a fonte de células foi medula óssea em 37 (44,57%) pts, sangue de cordão umbilical em 45 pts (54,21%) e 1 paciente recebeu medula óssea e sangue de cordão. Quarenta e seis pts receberam TCTH totalmente compatível, e 37 com algum grau de incompatibilidade. A DECH aguda grau II a IV ocorreu em 13/65pts avaliáveis e a DECH crônica limitada e extensa ocorreu em 4/64pts avaliáveis. As complicações mais frequentes foram infecções bacterianas (34/83) e virais (54/83). A infecção fúngica foi encontrada em 5 pts. Vinte e nove pts morreram entre 6 e 808 dias pós TCTH com uma mediana de 81 dias. A principal causa de óbito foi infecção, seguida da falha de pega do enxerto. A incidência cumulativa de mortalidade relacionada ao transplante (MRT) aos 100 dias foi de 20% e não houve diferença estatística entre os pts transplantados entre 2002-2006 e 2007 e 2012 (23% x 17% respectivamente). 54pts estão vivos entre 60 e 3720 dias pós TCTH (M: 1928) com uma sobrevida global (SG) de 63% em 2 anos. Não houve diferença estatisticamente significativa na SG de pts transplantados com doenças malignas ou não malignas, tipo de doador, fonte de células ou época do TCTH. 70% das crianças transplantadas por imunodeficiências estão vivas e bem assim como 64% das crianças com doenças malignas. **Conclusão:** Nos últimos anos houve um aumento da complexidade e uma ampliação das indicações dos TCTH especialmente nesta faixa etária. Neste estudo observamos uma boa sobrevida global principalmente nas crianças com imunodeficiências congênitas. Os TCTH realizados em crianças pequenas constituem um grande desafio para a equipe multidisciplinar e devem ser realizados em centros especializados e com uma equipe preparada para atendê-los.

## 1229

### Coleta de sangue de cordão umbilical e placentário - avaliação da celularidade de células CD 34+ em função do peso de recém-nascido

Santos SV<sup>1</sup>, Barros SM<sup>2</sup>, Marti LC<sup>3</sup>, Cipolletta AN<sup>1</sup>, Borba VA<sup>1</sup>, Kon-do AT<sup>1</sup>, Sakashita AM<sup>1</sup>, Ribeiro AA<sup>1</sup>, Kutner JM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

<sup>3</sup> Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa, Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein, São Paulo, SP

**Introdução:** O Sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) é utilizado como fonte de células-tronco hematopoéticas no transplante de medula óssea em pacientes sem doadores, familiares ou não, compatíveis. A RDC 56 da ANVISA (2010) determina que a unidade de sangue de cordão só deve ser congelada se atingir

a contagem mínima de  $5 \times 10^8$  do total de células nucleadas (TCN). Estudos demonstram que, quanto maior o número de células infundido, melhor e mais rápida será a recuperação hematopoética do paciente. Portanto, o total de células nucleadas e de células CD34+ são os principais fatores críticos para obtenção de unidades aptas para o congelamento e liberação posterior para transplante. Dentre os fatores que podem influenciar o conteúdo celular do SCUP podemos citar o peso do recém-nascido (RN). **Métodos:** Análise retrospectiva de 3473 unidades de SCUP coletadas no Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário Alógeno no período de Outubro/2004 a Junho/2008. O total de células nucleadas foi analisado no pré-processamento em contador automático e a quantificação de células CD34+ pós-processamento por citometria de fluxo. **Resultados:** As unidades SCUP apresentaram as seguintes medianas de TCN ( $\times 10^8$ ), de acordo com o peso do RN: 8,3 peso até 2750g; 10,3 peso >2750 até 3000g; 11,1 peso >3000 até 3250g; 12,8 peso >3250 até 3500g; 14,5 peso >3500g. As medianas para CD34+ ( $\times 10^6$ ) foram: 2,8 para peso até 2750g; 3,4 para peso >2750 até 3000g; 3,4 para peso >3000 até 3250g; 4,2 para peso >3250 até 3500g; 5,0 para peso >3500g. Do total de unidades coletado de RN com peso >3000g, 78,7% foram congeladas. **Conclusão:** Houve associação entre o peso do RN e o número total de células nucleadas e células CD34+ nas amostras analisadas.

## 1230

### Transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) para imunodeficiência combinada grave (SCID) análise de 21 pacientes transplantados em uma única instituição - serviço de transplante de medula óssea do Hospital De Clínicas Da Universidade Federal Do Paraná (STMO HC-UFPR)

Nichele S, Kwuhara C, Loth G, Ribeiro LL, Koliski A, Gomes RA, Pasquini R, Marinho D, Cat I, Bonfim C

Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR

**Introdução:** As síndromes de imunodeficiência combinada grave (SCID) são doenças raras causadas por defeitos genéticos que determinam ausência da função de linfócitos T, com ou sem função de linfócitos B e NK. A menos que se realize o transplante de medula óssea para reconstituição imunológica, costuma levar ao óbito dentro do 1º e 2º anos de vida em decorrência de infecções oportunistas. **Objetivos:** Analisar retrospectivamente os dados de 21 pacientes (pts) transplantados para SCID no STMO HC-UFPR quanto aos seus aspectos epidemiológicos e ao resultado do transplante. **Métodos:** Período: 05/1998 a 02/2012. 4/21: F, 17/21: M. Idade: 1,5 a 40,5 meses (mediana de 10,5 meses). Tipo TCTH: aparentado (AP) 11/21, não-aparentado (NA) 10/21. Condicionamento: nenhum 9/21, Bussulfano (Bu) 16 + Ciclofosfamida (Cy) +/- Globulina Antitimocítica (ATG) 2/21, Bu8 + Fludarabina (Flu) 3, somente Bu 4, outro regime 4. Compatibilidade: 11/21 compatíveis e 10/21 com alguma incompatibilidade. Fonte de células: Medula Óssea (MO) 14/21 e Sangue de Cordão Umbilical (SCU) 8/21. Média de Células Nucleadas Totais Infundidas: MO:  $6,14 \times 10^8$ /Kg e SCU:  $8,23 \times 10^7$ /Kg. Todos os pacientes receberam antibióticos profiláticos de acordo com a rotina do serviço. **Resultados:** Dentre os pacientes avaliáveis, a maior proporção de pega completa foi observada no grupo que recebeu bussulfano (6/8). Quimerismo: 5/18 completo e 13/18 misto. 6/12 desenvolveram Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) aguda grau II-IV e 2/12 DECH crônica extensa. No momento nenhum apresenta DECH aguda ou crônica. Apenas 1 paciente ainda recebe imunoprofilaxia. 3 pacientes foram retransplantados. Infecções virais e bacterianas ocorreram em 16/21 pts e juntas foram responsáveis por 50% dos óbitos. 14/21 apresentavam BCGite pré-TCTH e houve reativação em 13/21, sendo que 2 pts apresentaram micobacteriose dissemi-

nada e destes, 1 ainda se encontra em tratamento com mais de 100 dias pós-TMO. Apenas 2 pts ainda necessitam de imunoglobulina G intravenosa. 14/21 pts estão vivos e bem entre 14 e 4031 dias pós transplante. A sobrevida global foi de 66,7% em 11 anos. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à fonte de células, ao tipo do doador e à idade da criança em meses no momento do TCTH. Mortalidade Relacionada ao Transplante em 100 dias: 24,8%. **Conclusão:** Os Resultados do TCTH neste pequeno grupo de pacientes ainda são inferiores quando comparados aos da literatura. Além do encaminhamento tardio existem poucos leitos disponíveis para o TCTH deste tipo de paciente o que retarda ainda mais o tratamento curativo. Em nosso meio a BCGíte/Micobacteriose disseminada compõem importante causa de morbidade.

### 1231

#### Uso de plerixafor (Mozobil) em pacientes com indicação de transplante autólogo após falha de mobilização – experiência da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Fraga C, Capra M, Brun C, Brum D, Costa P, Pitana K, Oliveira CT, Capra M, Souza SR, Barison M, Fogliatto L

Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – SCPA, Porto Alegre, RS

**Introdução:** O transplante autólogo de células progenitoras (CP) é uma estratégia de resgate após quimioterapia de altas doses com indicações bem estabelecidas. Recomenda-se a infusão de no mínimo  $2 \times 10^6$  CD34/Kg para garantir enxertia adequada. As células são obtidas através de leucoaférese realizada após mobilização com fatores de crescimento (G-CSF) na dose de 10 µg/Kg durante quatro dias. Em até 30% dos casos, não é possível obter concentração de CP suficientes. Fatores preditores de falha de mobilização incluem idade acima de 60 anos, plaquetopenia, linfoma como doença de base, exposição à radioterapia e tratamentos contendo melfalano, fludarabina e lenalidomida. Além dos riscos de complicações infecciosas, os esquemas de mobilização que associam G-CSF à ciclofosfamida estão associados à taxa considerável de insucesso. O plerixafor (Mozobil®), recentemente disponível no Brasil, é um inibidor reversível do CXCR4 que impede a ligação das CP ao estroma da medula óssea. Sua administração promove um rápido incremento de células CD34 no sangue periférico. **Objetivos:** Descrever a experiência de nosso serviço com uso de plerixafor (Mozobil®) em pacientes com falha de mobilização. **Métodos:** Revisão dos casos de pacientes, portadores de linfoma e mieloma com indicação de transplante autólogo que fizeram uso de plerixafor (Mozobil®) após falha de mobilização com G-CSF isoladamente ou associado a quimioterapia, internados na Santa Casa de Porto Alegre desde junho de 2011 a junho de 2012. **Resultados:** Plerixafor (Mozobil®) foi utilizado em seis pacientes com idade de 15 a 62 anos, sendo cinco do sexo masculino. Dentre eles, três pacientes eram acometidos por linfoma não-Hodgkin, dois por linfoma de Hodgkin e um por mieloma múltiplo. Todos apresentavam pelo menos um fator de risco para falha de mobilização. Na tentativa de re-mobilização, após G-CSF na dose de 10 µg/Kg durante quatro dias, os pacientes recebiam uma ampola de plerixafor (Mozobil®) dez horas antes de cada sessão de aférese. Nenhum paciente apresentou reações adversas graus III ou IV. A maioria necessitou de apenas uma coleta. Os pacientes que necessitaram de mais de uma coleta apresentavam doença em remissão parcial e mais de um dos fatores preditores de falha. **Conclusão:** O plerixafor (Mozobil®), além de apresentar perfil de baixa toxicidade, é uma alternativa eficaz para os pacientes que apresentam falha de mobilização.

### 1232

#### Aplicação de um escore de predição de prognóstico em pacientes com neoplasia hematológica submetidos a transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas

Teixeira GM, Macedo AV, Cancela CS, Rezende SM, Bittencourt H

Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG

**Introdução:** O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTHALO) pode ser uma opção curativa para um grande número de neoplasias hematológicas. Fatores como doença de base e *status* de remissão influenciam no seu sucesso e são responsáveis por grande heterogeneidade de Resultados. Recentemente, Armand e cols. (*Blood* 2012;120: 905-913) propuseram um novo índice de risco de doença/*status* de doença (“RDS”) na estratificação prognóstica do TCTHALO. **Objetivo:** Aplicar o índice de risco proposto por Armand e cols. em pacientes com neoplasia hematológica submetidos a TCTHALO correlacionando-o com desfechos clínicos relevantes. **Métodos:** Estudo prospectivo unicêntrico de adultos e crianças submetidos a TCTHALO entre mar/2008 e jun/2012. De 118 pacientes, 86 com neoplasia foram classificados de acordo com a doença de base e o *status* de remissão ao transplante. As leucemias agudas (LAs) e mielodisplasias (SMD) foram classificadas segundo o risco citogenético proposto pelo SWOG/ECOG. As LAs sem citogenética disponível foram categorizadas no grupo de risco intermediário, e, no caso dos linfomas não-Hodgkin, estes foram subdivididos em agressivos e indolentes. Quanto ao *status* de doença, considerou-se: remissão completa (RC≥1), remissão parcial (RP, no caso de linfomas), recidiva, e doença refratária. Os casos de leucemia mielóide crônica (LMC) foram classificados em “fase crônica” ou “avançada”. Em todos os pacientes, o índice RDS foi utilizado para a estratificação de risco em “baixo”, “intermediário”(int.) e “alto”. Devido ao pequeno número de pacientes do grupo “altíssimo risco”, estes foram incluídos no grupo “alto risco”. Desfechos analisados: sobrevida global (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE) em 4 anos. **Resultados:** Houve predomínio do sexo masculino (55.8%), com mediana de idade de 36,5 anos. Leucemia mieloide aguda, leucemia linfóide aguda, LMC e SMD responderam, respectivamente, por 40.7%, 23.3%, 14% e 7% dos casos. O TCTHALO aparentado representou 84.9% dos casos, sendo CTP a fonte de enxerto mais utilizada (75.6%). Regime de condicionamento mieloablativo (MA) foi utilizado em 77.9% e profilaxia com CSA+MTX, em 72.1%. Na estratificação de risco das doenças, observou-se: baixo risco-22.1%, int.-65.1%, e alto risco-12.8%. Quanto ao *status* de doença, alto risco compreendeu 38.4%. Pelo índice RDS, observou-se: risco int. (58.1%), alto (31.4%), baixo (10.5%). Não houve diferença estatisticamente significativa na SG ( $p=0.56$ ) e SLE ( $p=0.78$ ) entre os regimes MA e não-MA. A SG pelo índice RDS foi: baixo risco-44.4%; int.-40.0%; alto-25.9% ( $p=0.40$ ); pelo risco-doença (RD): baixo risco-42.1%; int.-33.9%; alto-36.4% ( $p=0.81$ ); pelo *status* de remissão (SR): baixo risco-41.5%; alto-27.3% ( $p=0.24$ ). Na análise de SLE, a estratificação pelo RDS revelou: baixo risco-33%; int.-36%; alto-18.5% ( $p=0.27$ ); pelo RD: baixo risco-31.6%; int.-30.4%; alto-27.3% ( $p=0.97$ ); pelo risco SR: baixo-35.8%; alto-21.2% ( $p=0.23$ ). **Conclusão:** Neste estudo, a aplicação do índice de Armand e cols. mostrou que, apesar da tendência a diferentes desfechos para cada subgrupo de risco (segundo os três subíndices), não houve diferença estatística, tendo o pequeno tamanho da amostra contribuído para tal. Propõe-se, com isso, um estudo multicêntrico, prospectivo, para melhor esclarecimento desses achados.

**1233****Análise de 103 pacientes abaixo de 18 anos de idade submetidos a um segundo transplante de célula tronco hematopoética – Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**

Ribeiro LL, Loth G, Pasquini R, Nichele S, Kwuhara C, Bonfim C

*Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR*

Entre maio de 1983 a abril de 2011, um total de 103 pacientes foram submetidos a um segundo TCTH em nosso serviço após primeiro TCTH alogênico (73 aparentado X 30 não aparentado). Sessenta e quatro pacientes eram do sexo masculino. A mediana de idade no primeiro TCTH foi de 9 anos (1-18a). A indicação para o primeiro TCTH foi AAS (n=55), A Fanconi (n=25), LLA (n=3), LMA (n=8), LMC (n=7), LMMJ (n=3) e SMD (n=2). Setenta e um pacientes apresentavam HLA idêntico no primeiro TCTH, 11 apresentaram incompatibilidade antigênica em locus A ou B, 11 pacientes apresentaram incompatibilidade em DRB1. As indicações para realização de um segundo TCTH foram: falha primária de pega em 47 pacientes, rejeição tardia em 47 pacientes, recaída de doença em 9 pacientes. Mediana de tempo entre primeiro e segundo TCTH foi de 5 meses (1m a 113m). Para o segundo TCTH o mesmo doador foi usado em 69 pacientes. Quando trocado, selecionado outro doador familiar em 18 pacientes, sendo 3 doadores haplo-identicos; Dos outros doadores não relacionados, a fonte de célula tronco hematopoética era de medula óssea em 3 e sangue de cordão umbilical em 13 casos. Quarenta pacientes estão vivos com mediana de 178 meses (8,7-312m) com sobrevida global em 5 anos de 40%. Quando separadas, a sobrevida das doenças malignas foi de 26,1% comparada com 42,5% para falências medulares (AAS, AF). Em análise univariada a incompatibilidade ABO teve impacto na sobrevida dos pacientes, sobrevida de 28,9% comparada a 47,4% sem incompatibilidade (p=0,01). A sobrevida foi maior nos pacientes que realizaram segundo TCTH por rejeição tardia (63,8%) quando comparada a recaída de doença maligna (44,4%) e falha primária do enxerto (12,8%) p=0,000. Quando analisado intervalo entre o primeiro e segundo TCTH, a sobrevida foi maior quando o segundo TCTH era realizado com intervalo maior do que 6 meses do primeiro, 62,2%; Quando intervalo menor do que 6 meses a sobrevida foi de 20,7% (p=0,000). Os pacientes abaixo de 10 anos não apresentaram melhor sobrevida quando comparados com os de idade acima de 10 anos. Também não encontrado relação entre disparidade de sexo doador – receptor e pior sobrevida. Quando analisado tipo de doador para segundo TCTH, não houve diferença estatisticamente significativa entre mesmo doador ou novo. Separando as doenças de falências medulares, quando utilizado o mesmo doador a sobrevida foi melhor (p=0,015). Este estudo sugere que o segundo TCTH tem resultado favorável quando realizado após 6 meses do primeiro transplante e o mesmo doador pode ser usado com sucesso na maioria dos pacientes com aplasia de medula óssea.

**1234****Anemia aplásica grave com 13 anos de evolução com excelente resposta a transplante haploidêntico**

Pereira AD, Vilela VA, Carneiro TX, Xavier EM, Serpa MG, Rocha V, Novis Y, Rodrigues CA

*Hospital Sírio-Libanês – HSL, São Paulo, SP*

**Introdução:** A anemia aplásica (AA) é uma doença rara com incidência estimada em 2 pacientes por milhão de pessoas por ano. O diagnóstico depende de medula óssea hipocelular associada

a pelo menos duas citopenias, além da exclusão de causas secundárias de aplasia e de outras doenças hematológicas, especialmente anemia de Fanconi, disceratose congênita, exposição a medicações, infecções virais e síndrome mielodisplásica. A classificação de gravidade é importante para estratificação de risco e para a decisão terapêutica. Para a maioria dos pacientes com AA grave e para os com AA muito grave, o tratamento de escolha é o transplante de medula óssea aparentado. Infelizmente, apenas cerca de 30% dos pacientes tem doador disponível dentre os seus familiares. Para os demais pacientes, fontes alternativas têm sido estudadas, como o sangue de cordão umbilical e o transplante haploidêntico. Existem poucos casos relatados na literatura sobre transplante haploidêntico nesse grupo de pacientes.

**Relato de Caso:** Descrevemos o caso de um paciente masculino de 29 anos, sem antecedentes mórbidos, com diagnóstico de anemia aplásica grave desde 1999. Fez acompanhamento em diversos serviços de Hematologia, tendo recebido 2 tratamentos com globulina antitumoral associada a ciclosporina e um com alemtuzumabe e ciclosporina. Não teve resposta com nenhum dos tratamentos imunossupressores. Permaneceu com dependência transfusional de hemácias e plaquetas a cada 2 semanas, mantendo neutrófilos que variavam entre 500 e 1000/mm<sup>3</sup>. O paciente não possuía irmãos e não tinha doadores não aparentados compatíveis.

Foi optado por encaminhá-lo para transplante haploidêntico, utilizando-se a mãe como doadora, com compatibilidade HLA 5/10. No momento do transplante o paciente estava em boas condições clínicas, sem infecção ativa, com ferritina estável por volta de 1000µg/l, sem depósito significativo de ferro hepático nem cardíaco em uso de deferasirox. Foi realizado condicionamento com ciclofosfamida 14.5 mg/kg/dia nos dias -6 e -5, fludarabina 30 mg/m<sup>2</sup>/dia do dia -6 ao dia -2 e irradiação corporal total (TBI) de 200 cGy. Recebeu ainda ciclofosfamida 50 mg/kg nos dias 3 e 4 pós-transplante. Recebeu 1,06 X 10<sup>8</sup>/kg de células nucleadas totais, 1,81 X 10<sup>6</sup>/kg de células CD34+, e 11,7 X 10<sup>6</sup>/kg de linfócitos CD3+. Recebeu profilaxia de GVHD com ciclosporina (D-1 até o presente momento) e micofenolato mofetil do D+1 até o D+30. A enxertia neutrofílica ocorreu no D+20 com quimerismo completo do doador em sangue e medula óssea. A enxertia plaquetária ocorreu no D+21. Apresentou como intercorrências, um episódio de reativação de CMV por PCR quantitativo, tratado com sucesso preemptivamente com ganciclovir. Também apresentou quadro de microangiopatia trombótica leve iniciado no D+45, sem sintomas associados ou repercussão clínica significativa. Encontra-se atualmente no D+120, apresentando Hb: 10,4g/dl e plaquetas de 94000/mm<sup>3</sup>, além de leucócitos 1660/mm<sup>3</sup> e neutrófilos 1050/mm<sup>3</sup>, com quimerismo completo em sangue e medula no D+100.

**Conclusão:** Descrevemos um caso de sucesso terapêutico do transplante haploidêntico em paciente com AA grave e dependente transfusional há 13 anos. O transplante haploidêntico com a utilização de ciclofosfamida pós-transplante parece ser modalidade que pode ser considerada como válida alternativa para esse grupo de pacientes.