

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Igor Dullius Almeida**

**TRANSPLANTE AUTÓLOGO: CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE  
PRODUTOS DE *STEM CELL* HEMATOPOÉTICOS**

Porto Alegre  
Agosto de 2011

**Igor Dullius Almeida**

**TRANSPLANTE AUTÓLOGO: CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE  
PRODUTOS DE *STEM CELL* HEMATOPOÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Zubaran Goldani

Porto Alegre  
Agosto de 2011

Meus Sinceros Agradecimentos...

...A Jesus Cristo primeiramente, por conceder-me a vida, o discernimento e a sabedoria guiando meu caminho na trilha do bem. Obrigado pela força e ânimo mesmo nos momentos de fraqueza.

...A minha família, o qual é o meu alicerce, por apoiar-me em todos os momentos. Obrigado pelo amor e compreensão dados nesse tempo.

...Aos meus amigos por ajudarem-me nos momentos difíceis compartilhando alegrias e tristezas durante este tempo.

... Ao meu querido orientador Luciano Zubaran Goldani, por acreditar no meu trabalho e sempre que precisei estava lá para construção de meu aprendizado e conhecimento.

...A Liane Röhsig, a Tissiana, ao Thor e demais amigos e colegas do Serviço de Hemoterapia do HCPA. Obrigado pela ajuda e conhecimento transmitidos em prol de minha pesquisa, ao qual ajudara na qualidade de vida de transplantados.

*"Celebrar a vida é somar amigos, experiências e conquistas, dando-lhes sempre algum significado."*

"A tua palavra é lâmpada para guiar os meus passos, é luz que ilumina o meu caminho."( Salmo 119: 105)

## \_\_\_\_\_**LISTA DE FIGURAS**\_\_\_\_\_

<b>Figura 1:</b> Diferenciação de células-tronco embrionárias (CTE).....	12
<b>Figura 2:</b> Propriedade fundamental das células-tronco: divisões dando origem a células indiferenciadas e outras que se diferenciam e amadurecem.....	13
<b>Figura 3:</b> Hierarquia do sistema hematopoético.....	16
<b>Figura 4:</b> Modificação das fontes de células hematopoéticas para transplantes não-aparentados no período de 1996 a 2003.....	21
<b>Figura 5:</b> Tipos de lesão que podem ocorrer durante a criopreservação celular.....	34

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AABB	American Association of Blood Banks
ABC	ATP- Binding Cassette
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
B-HCG	human corionic gonadotrophin
BSCUP	Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
CD	Cluster of differentiation
CD133	Antígeno de superfície de célula progenitora hematopoética
CD3	Antígeno de superfície de célula T
CD33	Antígeno de superfície de célula progenitora mielóide
CD34	Antígeno de superfície de célula progenitora hematopoética
CPH	Célula progenitora hematopoética
CPHSP	célula progenitora hematopoética do sangue periférico
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoética
CTP	Célula-tronco periférica
CVC	Cateter venoso central
DECH/GVHD	Doença do enxerto contra hospedeiro
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECT	Enxerto contra tumor
ESBL	B-lactamases de espectro ampliado
FAHCT	Foundation for the Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy
FDA	Food and Drug Administration
G-CSF	colony stimulating factor (granulocyte)
GISA	glycopeptide- intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
GM-CSF	colony stimulating factor (granulocyte-monocyte)
HEA	hidroxetilamido
HLA	Antígeno leucocitário humano
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IL	Interleucina
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
MO	Medula Óssea
MRSA	<i>S.aureus</i> metilicilina-resistente
MSC/CTM	Célula-tronco mesenquimal

Nanog	Fator de transcrição Nanog
NK	<i>Natural Killer</i>
OCT4	Fator de transcrição Oct4
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph1	Cromossomo Filadélfia
RHCE	Reação hospedeiro contra enxerto
SCU	Sangue de cordão umbilical
SP	Sangue Periférico
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoéticas
Th	T Helper
TMO	Transplante de medula óssea
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Células-tronco: origens e propriedades.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Células-tronco hematopoéticas.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Identificação e isolamento das células-tronco hematopoéticas.....	17
1.2.2 O microambiente da célula-tronco hematopoética.....	18
1.2.3 Plasticidade da célula-tronco hematopoética.....	19
<b>1.3 Células-tronco hematopoética e seu uso Clínico.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Transplante de células-tronco hematopoéticas.....	20
1.3.2 Fontes de células-tronco hematopoéticas para transplantes.....	21
1.3.3 Aspectos biológicos das fontes de células-tronco hematopoéticas...22	
1.3.3.1 Compartimento Hematopoético.....	23
1.3.3.2 Compartimento Imunológico.....	23
1.3.3.3 Compartimento Acessório.....	24
1.3.4 Resultados clínicos do transplante de células-tronco hematopoéticas.....	25
1.3.4.1 Transplante Autólogo.....	25
1.3.4.2 Transplante Alogênico.....	27
1.3.4.2.1 Medula óssea x Sangue periférico.....	27
1.3.4.2.2 Medula óssea x Sangue de cordão umbilical.....	28
1.3.4.2.3 Resultados clínicos do transplante autólogo de medula óssea...30	
1.3.4.2.3.1 Tumores sólidos.....	30
1.3.4.2.3.2 Doenças onco-hematológicas.....	31
1.3.5 Criopreservação de células progenitoras hematopoéticas.....	33
1.3.5.1 Princípios da Criopreservação celular.....	33
1.3.5.2 Agentes Crioprotetores.....	35
1.3.5.3 Descongelamento e infusão.....	36
<b>1.4 Complicações infecciosas no transplante de Células-tronco hematopoéticas.....</b>	<b>37</b>
1.4.1 Os tipos de transplante e o risco de infecção.....	38



1.4.2	A fase de aplasia: neutropenia- o primeiro desafio.....	39
1.4.3	Uso de antibióticos em receptores de TCTH.....	41
1.4.3.1	Antibioticoprofilaxia.....	41
1.4.3.2	A antibioticoterapia empírica.....	45
<b>1.5</b>	<b>Contaminação bacteriana de produtos de <i>stem cell</i> hematopoéticas.....</b>	<b>47</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....</b>	<b>49</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
3.1	Objetivo Geral.....	49
3.2	Objetivo Específico.....	49
<b>4.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>86</b>

## RESUMO

**Objetivos.** As células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico (CPHSP) são comumente usadas para transplantes autólogos e alogênicos em pacientes com as mais diversas patologias onco-hematológicas, apesar da utilização de técnicas estéreis durante a coleta e o processamento desses produtos, a contaminação bacteriana pode ocorrer. Nosso objetivo foi investigar a contaminação microbiana em produtos de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico (CPHSP). **Material/Sujeitos e Métodos.** Culturas microbianas de 837 produtos de CPHSP entre 2000 e 2009 foram analisados retrospectivamente para determinar a incidência de positividade de cultura e identificar os principais organismos que causam contaminação. Os estudos microbiológicos foram realizados em um sistema automatizado (Bact/Alert ® bioMérieux). **Resultados.** Trinta e seis (4,3%) de 837 culturas microbianas foram contaminadas. O *Staphylococcus* coagulase-negativo foi a bactéria mais frequentemente isolada em produtos CPHSP (20 (56%) das 36 culturas microbianas positivas). Considerando-se as amostras, das 36 contaminadas, 22 produtos de CPHSP foram infundidos e 14 descartados. A terapia de infusão pré e pós- antibiótico dos produtos contaminados foi estabelecido com base no microorganismo isolado e seu antibiograma. **Conclusão.** Este estudo está de acordo com outras pesquisas publicadas, mostrando que a contaminação microbiana dos produtos de CPHSP é baixa, e a contaminação desses produtos, na maioria dos casos, não compromete o sucesso do transplante.

## \_\_\_\_\_ ABSTRACT \_\_\_\_\_

**Objectives.** The hematopoietic progenitor cells from peripheral blood (HPCPB) are commonly used for autologous and allogenic transplants in patients with the most various onco-hematological diseases despite the utilization of sterile techniques during collection and the processing of these products, bacterial contamination can occur. Our objective was to investigate the microbial contamination in hematopoietic progenitor cells from peripheral blood (HPCPB) products. **Material/Subjects and Methods.** Microbial cultures of 837 HPCPB products between 2000 and 2009 were retrospectively analysed to determine the incidence of culture positivity and identify the main organisms causing contamination. The microbiological studies were performed with an automatized system (BacT/Alert ® bioMérieux Corporate). **Results.** Thirty-six (4.3%) of 837 microbial cultures were contaminated. Coagulase-negative *Staphylococcus* was the most frequent bacteria isolated in HPCPB products (20 (56%) of the 36 positive microbial cultures). Considering the thirty-six contaminated samples, 22 HPCPB products were infused and 14 discarded. Pre and post infusion antibiotic therapy of the contaminated products was established based on the isolated microorganism and its antibiogram. **Conclusion.** This study is in accordance with other published surveys, showing that the microbial contamination of HPCPB products is low, and contamination of those products, in most cases, does not compromise the success of the transplant.



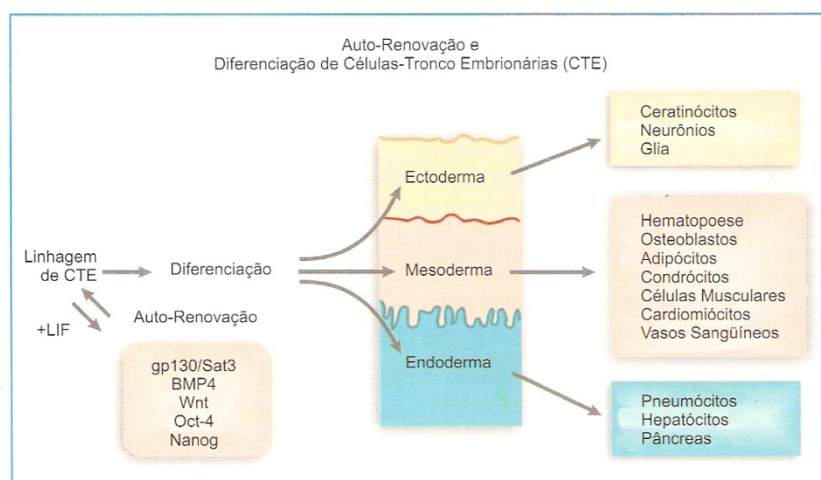
# 1-INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

### 1.1 Células-tronco: origens e propriedades

O termo célula-tronco (CT), do inglês *stem cell*, diz respeito a células precursoras que possuem a capacidade de diferenciação e auto-renovação, ou seja, de dar origem a células idênticas a elas mesmas, assim originando uma variedade de tipos teciduais.<sup>1</sup> São células indiferenciadas que através de estímulos específicos podem originar células diferenciadas.<sup>2</sup>

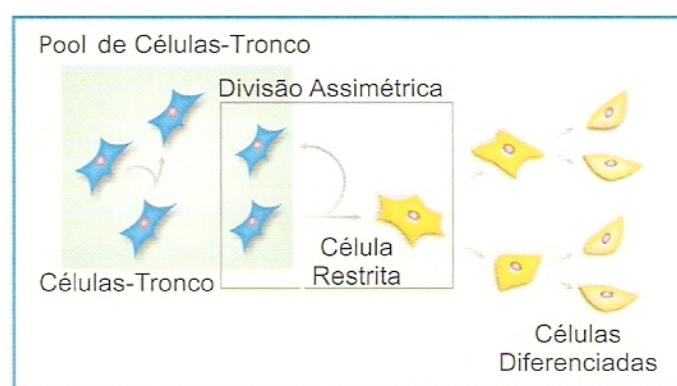
As células-tronco têm um papel crítico durante o desenvolvimento no estabelecimento dos tecidos embrionários e, em alguns casos, são mantidas na vida adulta, onde elas irão atuar na produção de células maduras em sistemas nos quais as células têm vida curta, e também, na regeneração de tecidos que foram danificados por injúria ou degeneração.<sup>3</sup> Estas células chamadas de células-tronco embrionárias (CTE) foram inicialmente isoladas em 1998. CTE são capazes de originar células das três camadas germinativas; endoderme, mesoderme e ectoderme (Figura 1), assim sendo denominadas pluripotentes.<sup>4</sup> Essas células já foram descritas como capazes de originar células do trofoblasto, mediante estímulo.<sup>5</sup> Durante o desenvolvimento embrionário, o trofoblasto é que irá gerar estruturas extra-embrionárias, tais como placenta, cordão umbilical e saco amniótico.<sup>6</sup>



**Figura 1-** Células-tronco embrionárias dão origem aos três folhetos do embrião dos quais derivam todos os tecidos do adulto.

Fonte: Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Atheneu, 2006, p.8.

Células-tronco diferem de outras células do organismo por apresentarem três características: 1ª são células indiferenciadas e não-especializadas; 2ª são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes; 3ª são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular. Estas células são capazes de fazer “divisões assimétricas”, ou seja, podem originar células que permanecem indiferenciadas, repondo o pool de células-tronco, ou alternativamente podem se diferenciar em células especializadas (Figura 2).<sup>7</sup>



**Figura 2-** Propriedade fundamental das células-tronco: são capazes de se dividir dando origem a células que permanecem indiferenciadas, repondo o pool de células-tronco, ou a células que se diferenciam e amadurecem.

Fonte: Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Atheneu, 2006, p.5.

As CTE mantém o seu estado de pluripotência através da expressão de fatores de transcrição essenciais tais como, Oct4 e Nanog. Esses fatores são capazes de ativar genes relacionados à auto-renovação e reprimir genes que levam a diferenciação celular, estando à expressão diretamente relacionada à células pluripotentes.<sup>8</sup> A expressão destes genes é reprimida durante a diferenciação celular.<sup>9</sup> Neste sentido, um trabalho recente demonstrou a importância da expressão do gene Oct4, expresso somente em células pluripotentes do embrião mamífero, na capacidade de proliferação celular.<sup>10</sup> Quando sua expressão foi induzida em células adultas, este gene conferiu uma capacidade maior de proliferação e diferenciação àquelas células. Tal trabalho demonstrou como as pesquisas com CTE podem elucidar vias envolvidas na

pluripotência de células-tronco, o que por sua vez pode no futuro servir de base para modificarmos células-tronco adultas de forma a aumentar sua capacidade de diferenciação e proliferação.

Porém, para que seja cumprida toda a promessa terapêutica das CTE, alguns obstáculos importantes devem ser superados. Um deles diz respeito ao risco das células derivadas das CTE virem a formar tumores *in vivo*. De fato as CTE têm propensão a formar teratomas, o que foi verificado em transplantes experimentais.<sup>11</sup> Tais tumores podem ser formados de diverso tipos celulares, já que são derivados de células embrionárias. Podendo conter estruturas complexas; como rins com seus corpúsculos, túbulos e vasos, além de folículos capilares, gânglios neurais, musculatura esquelética e células primitivas.<sup>12</sup>

Outras questões que precisam ser resolvidas antes de utilizarmos as CTE em humanos dizem respeito às instabilidades cromossômicas observadas nestas células após longo tempo em cultura<sup>13,14</sup>. Cultivadas por longo período demonstraram instabilidade genômica, com alterações genéticas e epigenéticas.<sup>15</sup> Tais alterações podem ser geradas por diferentes eventos, tais como mutações e perdas de heterozigidade, o que poderia limitar suas aplicações terapêuticas.<sup>16</sup>

A lei de Biossegurança (Lei 11.105, de 24 de março de 2005) possibilitou, “para fins de pesquisa e terapia” a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento”<sup>17</sup> Duas foram as condições impostas pela referida legislação, de maneira alternativa: que referidos embriões sejam inviáveis ou que estejam congelados há três anos ou mais, na data da publicação da lei ou que completarem três anos após a data do congelamento. O consentimento dos genitores é, também, condição essencial para utilização dos referidos embriões em pesquisas e terapias. Podemos dizer que o respeito à autonomia dos genitores constitui grande avanço para o reconhecimento dos direitos da pessoa, que é o alvo maior da proteção jurídica. A clonagem, independente de sua finalidade, restou proibida, e a pena prevista para a sua realização é de reclusão, de dois a cinco anos, e multa, conforme estabelece o artigo 26 da lei de Biossegurança.



Atualmente, estudos com CTE limita-se a pesquisa básica, na identificação de mecanismos envolvidos na proliferação e diferenciação de células-tronco. Já as células-tronco adultas (CTA) possuem aplicações clínicas bem fundamentadas. E estudos sobre suas características têm sido ampliados.

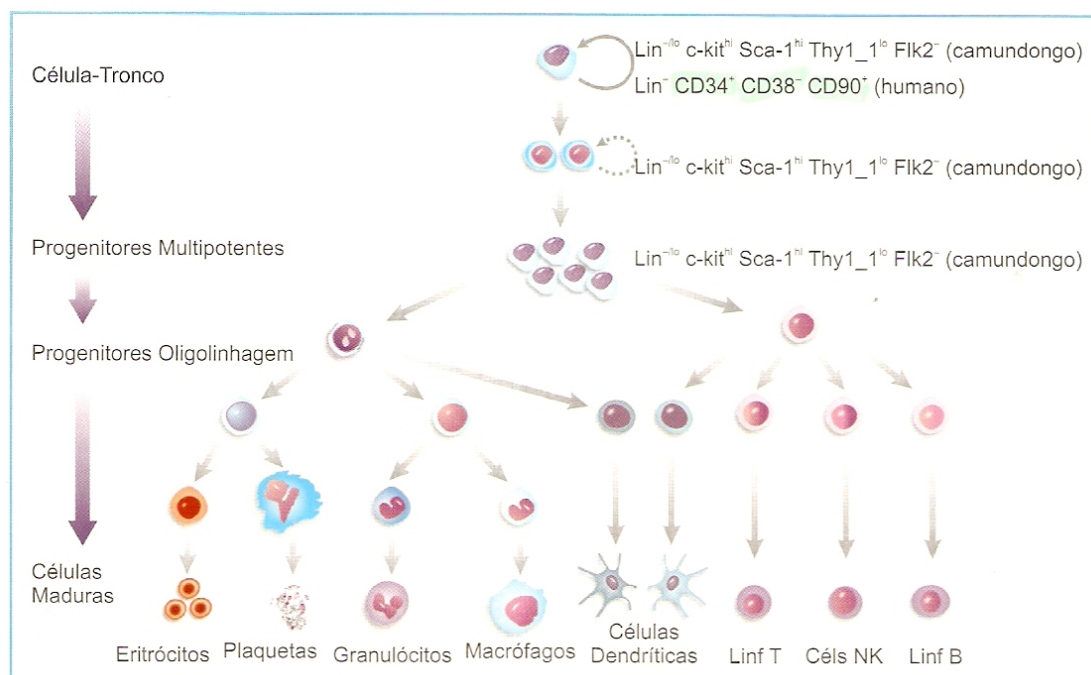
Além do embrião, as células-tronco também são encontradas em vários órgãos e tecidos no indivíduo adulto, onde participam da homeostase tecidual, gerando novas células devido à renovação fisiológica ou em resposta a uma injúria, assim conservando a integridade dos tecidos em que se encontram. Tais populações celulares indiferenciadas mantidas no organismo adulto são denominadas células-tronco adultas (CTA).<sup>18,19</sup> Estas células, assim como as CTE, apresentam a telomerase, não estando, portanto, sujeitas à senescência celular, fenômeno que ocorre nas demais células somáticas diplóides, devido ao encurtamento do telômero após sucessivas mitoses.<sup>1,20,21</sup> As células-tronco adultas estão em estado quiescente ou em baixa proliferação, localizando-se em regiões específicas essenciais para o seu desenvolvimento e a manutenção de seus atributos, particularmente a capacidade de auto-renovação.<sup>22</sup>

As CTA já foram encontradas em vários tipos de tecidos, tais como hematopoético, muscular, nervoso e trato gastrintestinal. Originando células progenitoras e precursoras dos diversos tipos celulares encontrados nos tecidos de origem. As CTA e suas células progenitoras são morfológicamente semelhantes, o que dificulta sua identificação. Portanto marcadores de superfície específicos têm sido identificados a fim de melhorar a caracterização e purificação das células-tronco adultas.<sup>23</sup>

As características de CTA são semelhantes às de CTE, pois são capazes de se auto-renovarem e de dar origem a células diferenciadas de tecidos específicos. Mas sua capacidade proliferativa e de diferenciação é limitada, tornando sua aplicação restrita. Por esta razão, CTA é reconhecida como multipotente, não sendo capaz de se diferenciar em qualquer tipo de células que se encontra no organismo.

## 1.2 Células-tronco Hematopoéticas

As células que compõem o sangue, ou células hematopoéticas, exibem características diferentes das de outros órgãos vitais, tais como tempo de vida relativamente curto, multiplicidade de tipos celulares e grande dispersão no organismo. Duas linhagens principais são reconhecidas entre as células sanguíneas. A linhagem linfóide inclui os linfócitos B, T e NK (*natural killer*), enquanto a linhagem mielóide inclui os eritrócitos, megacariócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Estas células originam-se todas de um precursor comum, através de várias etapas de maturação, de modo que o sistema hematopoético pode ser visto como uma hierarquia com origem nas células-tronco hematopoéticas (Figura 3).<sup>24</sup>



**Figura 3:** Hierarquia do sistema hematopoético. As células sanguíneas maduras originam-se de um precursor comum, através de várias etapas de maturação.

Fonte: Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Atheneu, 2006, p.50.

A célula-tronco hematopoética (CTH) é a mais bem caracterizada entre as células-tronco adultas, sendo conhecida há mais de 50 anos. O primeiro

transplante bem sucedido de CTH de medula óssea (MO), em humanos, foi realizado em 1959 pela equipe liderada por Thomas E.D., demonstrando que as células do doador eram capazes de re-popular a MO do receptor e produzir células sanguíneas.<sup>25</sup> A partir destes estudos, foram descritas para as CTH as duas características que até hoje definem as células-tronco órgão-específicas encontradas em organismos adultos: a) a capacidade de auto-renovação, que permite que o compartimento de células-tronco seja mantido ao longo do tempo; e b) a capacidade de originar células maduras, diferenciadas em uma ou mais linhagens.

Em termos clínicos, CTH são utilizadas no tratamento de leucemias, linfomas, anemia aplástica e doenças hereditárias do sangue, tais como talassemia e anemia falciforme, por meio de transplantes de medula óssea autólogos ou alogênicos.<sup>26</sup>

### **1.2.1 Identificação e Isolamento das Células-Tronco Hematopoéticas**

As células-tronco hematopoéticas são raras, correspondendo a 0,05% a 0,5% do total de células da medula óssea e sangue de cordão umbilical (SCU), e bem menos no sangue periférico. Apresentam baixa taxa de proliferação, sendo estimado que, a qualquer momento, apenas 4% se encontram na fase S/G2/M.<sup>27</sup>

Quanto ao seu fenótipo de superfície, a presença do antígeno CD34 é o principal marcador dessa população. Aproximadamente de 1% a 3% das células mononucleares da medula óssea expressam essa proteína<sup>28</sup>, cuja função parece estar relacionada aos processos de localização/ adesão das células-tronco e progenitoras.<sup>29</sup> além de CD34, outros marcadores de superfície e certos corantes têm sido utilizados para a caracterização do fenótipo da CTH, que atualmente pode ser definida como CD34+, CD38-, CD33-.<sup>30</sup> Outro marcador mais recentemente descrito, e que pode estar associado a uma CTH diferente (talvez mais precoce) da mais convencionalmente estudada, é CD133.<sup>23</sup> Estudos comparativos demonstraram que o marcador CD133 é expresso em células mais primitivas que células

CD34+, e ainda hipo-expresso durante o processo de diferenciação celular.<sup>31,32</sup> Sendo a expressão de CD133 presente na grande maioria das células CD34+, mas também na população mais primitiva de células CD34-<sup>33</sup>, desta forma podendo originar tanto células hematopoéticas como outros tipos celulares, tais como células progenitoras endoteliais.<sup>34</sup>

Mais recentemente, foi descrito um novo método para identificação e isolamento das CTH, baseado em sua capacidade de excluir o corante Hoechst 33342. O corante entra em células vivas, mas é ativamente bombeado para fora delas por transportadores ABC (ATP- Binding Cassette). Uma pequena subpopulação de células da medula óssea é particularmente eficiente na exclusão do corante, por ter este sistema mais ativado.<sup>35</sup> Estas células apresentam características de células-tronco e parece conter uma subpopulação ainda mais primitiva, com alta capacidade de colonização após transplante.<sup>36,37</sup>

Este conjunto de marcadores de superfície tem sido explorado para o isolamento das CTH, por citometria de fluxo.

### **1.2.2 O microambiente da célula-tronco hematopoética**

No organismo adulto, o processo de diferenciação hematopoética depende de interações entre células-tronco e progenitoras e seu microambiente. Na medula, a hematopoese é restrita ao compartimento extravascular, onde as células hematopoéticas encontra-se associadas com uma variedade de células teciduais (estromais) e separadas do compartimento vascular pelas células endoteliais. Devido a localização o microambiente é pouco acessível a estudos *in vivo*, sendo que a maior parte do conhecimento sobre sua função e componentes advém das culturas *in vitro*.<sup>38</sup>

As células do microambiente podem regular a hematopoese interagindo diretamente com as células-tronco/progenitoras ou secretando as moléculas reguladoras que influenciam de uma maneira positiva ou negativa sua diferenciação.<sup>39</sup> Além das citocinas, as células estromais produzem e secretam

as macromoléculas que formam a complexa matriz extracelular. Pode-se dizer que as células estromais incluem células reticulares (adventícias e fibroblásticas), macrófagos, células endoteliais e adipócitos.<sup>40</sup>

Os principais componentes da matriz extracelular são os colágenos, as glicoproteínas e os proteoglicanos. Tais moléculas estão envolvidas em diferentes funções biológicas, como a adesão e antiadesão celular, a captura e apresentação de diferentes citocinas às células hematopoéticas e a regulação do crescimento celular.<sup>38</sup>

Com relação ao componente celular, o microambiente é formado por células fixas – as células estromais – e células não-fixas – as células acessórias (linfócitos e monócitos) que durante sua presença transitória na medula podem produzir substâncias reguladoras e influenciar no processo hematopoético.

Pode-se dizer de uma maneira geral que, entre as várias funções do microambiente hematopoético, incluem-se: a comunicação intercelular direta com as células hematopoéticas, a produção de fatores de crescimento e sua estabilização via união a moléculas da matriz ou proteínas de membrana.<sup>41</sup>

A combinação desses fatores reguladores externos e das características intrínsecas das células podem, assim, permitir ou não sua sobrevivência, manter ou não seu estado de quiescência e potencial de auto-renovação, ou permitir sua diferenciação.<sup>42,43</sup>

### **1.2.3 Plasticidade da célula-tronco hematopoética**

Plasticidade é o potencial de formação de diferentes tipos de células maduras. Esta é a maior vantagem quando se compara a CTE com as de adultos, já que a primeira é, em princípio, capaz de originar qualquer dos tipos de tecidos que compõem o organismo adulto. A questão chave, ainda não respondida, é portanto qual o grau de plasticidade das CTA, em especial a CTH. Assim como para vários outros tipos de CTA, o verdadeiro grau de plasticidade das CTH permanece pouco conhecido.<sup>44</sup>

Pesquisas publicadas a partir de 1997 mostraram marcadores presentes em células da medula óssea transplantadas, identificados em vários outros tipos de tecidos no receptor, levaram a interpretações que apontavam sua alta plasticidade. Foi sugerido então que as CTH podiam originar astrócitos, músculo esquelético, miocárdio, hepatócitos, epitélio renal e neurônios e células gliais no sistema nervoso central.<sup>45-53</sup>

Porém, a partir de 2001 as interpretações atribuindo alta plasticidade as células-tronco transplantadas começaram a ser questionadas.<sup>54</sup>

Recentemente, outra hipótese tem sido sugerida para explicar os resultados referentes à capacidade de células da medula óssea originarem vários tipos de tecido e repararem diferentes tipos de lesões. Neste sentido, é dada especial atenção à heterogeneidade de tipos celulares presentes na medula óssea. Posteriormente, foi demonstrada a presença da células-tronco mesenquimal (CTM), que originava os elementos do estroma da medula óssea e vários outros tipos de células.<sup>55</sup>

Portanto, a medula óssea hospedaria além destes dois tipos celulares e de precursores endoteliais já conhecidos, múltiplos outros tipos de células-tronco tecido-específica, de modo que quando a medula total é empregada os resultados são explicados mais por sua heterogeneidade que por sua plasticidade.<sup>56</sup>

### **1.3 Células-tronco hematopoética e seu uso Clínico**

#### **1.3.1 Transplante de células-tronco hematopoéticas**

O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) consiste na infusão de células com a função de restabelecer a hematopoese no receptor.

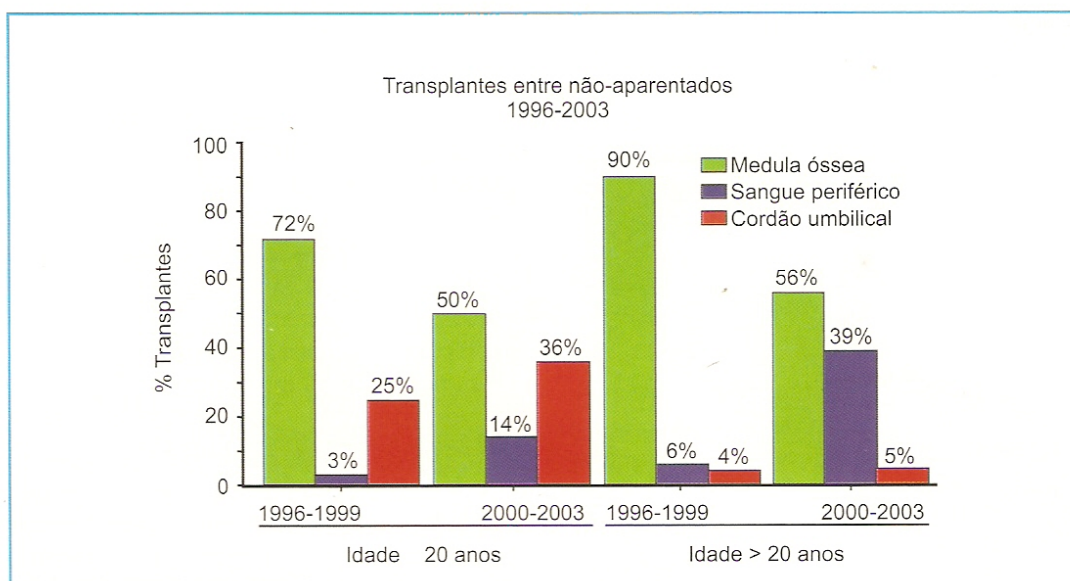
O conceito de altas doses de quimioterapia seguidas da infusão de *stem cells* hematopoéticas foi incorporado ao contexto terapêutico com a finalidade de cura para uma série de neoplasias hematológicas e tumores sólidos. A utilização dessa estratégia terapêutica, denominada classicamente transplante de medula óssea (TMO), tem crescido exponencialmente nos últimos anos.<sup>57</sup>

Como parte do procedimento de TMO, seja ele autólogo (células obtidas do próprio paciente) ou alogênico (células obtidas de um doador), a medula óssea (MO) ou o sangue periférico (SP) são utilizados como fonte de células-tronco hematopoéticas (CTH) ou *stem cells* hematopoéticas (SCH), que irão promover a recuperação hematológica após o tratamento, com a quimioterapia em altas doses. Mais recentemente, as células do cordão umbilical vêm sendo empregadas como fonte alternativa de *stem cells*.<sup>57</sup>

Avanços importantes referentes ao TMO, utilizando *stem cells* hematopoéticas, provenientes da MO ou do sangue periférico, ocorreram nas últimas décadas, evidenciando o potencial dessas células em restaurar a hematopoese.<sup>57</sup>

### 1.3.2 Fontes de células-tronco hematopoéticas para transplantes

Embora a medula óssea seja a fonte mais conhecida de células-tronco hematopoéticas, diversos estudos publicados desde a década de 80 demonstraram resultados clínicos semelhantes quando se utilizavam células-tronco obtidas do sangue periférico após mobilização com fatores de crescimento ou obtidas do sangue placentário ou do sangue de cordão umbilical (Figura 4).<sup>58</sup>



**Figura 4:** Modificação das fontes de células hematopoéticas para transplantes não-aparentados no período de 1996 a 2003. O aumento do uso de células de sangue de cordão umbilical é mais notório entre crianças e adolescentes (principalmente em virtude do menor peso corporal).

Fonte: Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Atheneu, 2006, p.119. (IBMTR/ABMTR Newsletter. 2003;10:7-10)

O transplante de células-tronco hematopoéticas periféricas é bem aceito como forma de tratamento de doenças malignas ou não. Desde o início dos anos 90, as CTP, colhidas por aférese após mobilização com fatores de crescimento de colônias de granulócitos ou de granulócitos-macrófagos (G-CSF ou GM-CSF), têm sido largamente usadas como fonte de células progenitoras hematopoéticas para o transplante autólogo e levam à recuperação medular (número de células polimorfonucleadas maior que  $500/\text{mm}^3$  e número de plaquetas maior que  $20.000/\text{mm}^3$ ) mais rápida, quando comparadas com a MO.<sup>59</sup>

### **1.3.3 Aspectos biológicos das fontes de células-tronco hematopoéticas**

Para melhor ilustrar-mos, podemos dividir o enxerto a ser transplantado em três compartimentos: 1. O compartimento hematopoético, onde se encontram as células-tronco hematopoéticas que irão restaurar a hematopoese no paciente transplantado; 2. O compartimento imunológico, que consiste nas células responsáveis pelas reações alogênicas (constituída pelos linfócitos); e 3. Um compartimento cuja função ainda não está totalmente esclarecida, chamado acessório, onde se encontram as células mesenquimais, os osteoblastos e as células adiposas.<sup>60</sup>

Cada uma das diferentes fontes de enxerto para transplante apresenta características particulares em cada um destes compartimentos. Estas diferenças, tanto quantitativas quanto qualitativas (funcionais), são reflexos da própria origem da CTH. No caso do sangue de cordão umbilical, as propriedades do compartimento hematopoético (maior proliferação celular) e do imunológico (“imaturidade” dos linfócitos) refletem a própria ontogenia da hematopoese. Por outro lado, a composição e as propriedades do enxerto proveniente do sangue periférico vão refletir em grande parte a ação direta dos fatores de crescimento hematopoéticos e também os efeitos da maior manipulação do enxerto quando da coleta pela aférese.<sup>60</sup>



### 1.3.3.1 Compartimento Hematopoético

A quantidade de células-tronco hematopoéticas presentes no enxerto varia de acordo com a sua fonte. O percentual de células que expressa a molécula CD34 no sangue periférico é da ordem de 0,1%, podendo aumentar para valores entre 0,5% e 4% após estimulação com fatores de crescimento hematopoéticos, como G-CSF *colony stimulating factor (granulocyte)* ou GM-CSF *colony stimulating factor (granulocyte-monocyte)*. Na medula óssea e no cordão umbilical, a porcentagem de células CD34+ situa-se entre 1% e 3% e menor que 1%, respectivamente.<sup>61,62</sup>

Existem características funcionais específicas para cada grupo de CTH de acordo com a sua fonte. As CTH do sangue de cordão umbilical, por exemplo, apresentam uma maior capacidade de expansão *in vitro*, que se traduz num aumento significativo dos progenitores hematopoéticos, quando comparadas às CTH provenientes da medula óssea ou do sangue periférico. Este diferente potencial de proliferação entre as células-tronco hematopoéticas provenientes do sangue de cordão umbilical e as provenientes da medula óssea pode ser explicado devido ao encurtamento dos telômeros decorrente da idade.<sup>63</sup>

### 1.3.3.2 Compartimento Imunológico

O conteúdo de linfócitos presentes no enxerto influencia o desfecho dos transplantes de células-tronco hematopoéticas de diferentes maneiras. A pega tanto de transplante autólogo quanto alogênico é facilitada pela presença de determinadas subpopulações de linfócitos no enxerto. Um conteúdo aumentado de células CD3+/CD8+ no enxerto de medula óssea proporciona recuperação mais rápida dos neutrófilos após transplante.<sup>64</sup> Por outro lado, a retirada (expurgo ou *depletion*) de células T do enxerto está associada a uma maior probabilidade de não-pega do enxerto.<sup>65</sup>

Os linfócitos do enxerto, assim como os do próprio receptor, ocasionam, no transplante alogênico de CTH, reações imunológicas recíprocas do enxerto contra o paciente, a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH ou GVHD- *graft versus host disease*) e do paciente contra o enxerto (rejeição ou RHCE- reação hospedeiro contra enxerto). Este conflito imunológico pode ainda ser responsável pelo reconhecimento e destruição de eventuais células tumorais residuais no paciente que apresentem antígenos tumorais específicos ou antígenos menores de histocompatibilidade (efeito ECT-enxerto contra tumor). O sistema HLA tem um papel importante nessas reações.<sup>66</sup>

Os diferentes resultados clínicos entre os transplantes utilizando medula óssea, sangue periférico ou do cordão umbilical podem também ser explicados pelas diferenças existentes entre os compartimentos imunológicos de cada tipo de enxerto. Por exemplo, no compartimento imunológico do sangue de cordão umbilical, os linfócitos são mais imaturos ou “ingênuos” (*naive*), e a produção de citocinas difere dos linfócitos provenientes da medula óssea ou do sangue periférico. Também foi demonstrado que o uso de G-CSF nos doadores de CTH do sangue periférico modifica o perfil de secreção de citocinas pelos linfócitos, com uma produção aumentada de citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-10) e uma redução da produção de citocinas do tipo Th1 (IL-2 e interferon gama). Estas diferenças nos compartimentos imunológicos, associadas ao sistema HLA, podem explicar, em parte, as diferentes reações alogênicas observadas após um transplante de CTH.<sup>67</sup>

#### 1.3.3.3 **Compartimento Acessório**

Muitas células presentes no enxerto auxiliam no processo da hematopoese e compõem o compartimento acessório do enxerto, do qual fazem parte os fibroblastos, adipócitos, osteoblastos, células endoteliais e macrófagos. Estas células constituem o chamado microambiente medular, responsável pela produção de uma série de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento muitos dos quais são fundamentais em diferentes fases da

hematopoese, além de prover moléculas de adesão e nichos específicos para o desenvolvimento da hematopoese. O emprego de altas doses de quimioterapia ou radioterapia no condicionamento Pré-transplante pode danificar este microambiente, prejudicando a recuperação da função medular pós-transplante. Sugere-se que o componente acessório do enxerto ajude na reconstituição do microambiente danificado.<sup>68</sup>

A infusão de células-tronco hematopoéticas obtidas do sangue associadas a células-troco mesenquimais expandidas *in vitro* acelerou a recuperação hematológica após transplante autólogo para câncer de mama.<sup>69</sup>

Mais recentemente foi demonstrado que as células mesenquimais do compartimento acessório possuem propriedades imunossupressoras *in vivo*, tendo sido utilizadas no tratamento da doença do enxerto contra hospedeiro refratária a diversos imunossupressores.<sup>70</sup>

Embora presentes primariamente na medula óssea, existem evidências de que progenitores de células mesenquimais também estão presentes no enxerto proveniente do sangue periférico e do sangue placentário.<sup>71,72,73</sup>

### **1.3.4 Resultados clínicos do transplante de células-tronco hematopoéticas**

#### **1.3.4.1 Transplante Autólogo**

O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas consiste no uso de doses mieloablativas de quimioterapia em altas doses, associada ou não à radioterapia, com o intuito de contornar a resistência das células neoplásicas às doses usuais, seguida do uso de células-tronco para resgatar ou acelerar a recuperação da hematopoese. O transplante autólogo ganhou impulso durante a década de 1970 como alternativa ao transplante alogênico, pois não havia a

dificuldade de se localizar um doador compatível e não havia o problema da DECH.<sup>74</sup>

Inicialmente haviam muitas dúvidas sobre o real papel da reinfusão das células-tronco autólogas na reconstituição hematopoética.<sup>75</sup> Um estudo realizado mostrou definitivamente que as células-tronco eram essenciais para a boa evolução do transplante.<sup>76</sup>

Usada inicialmente como fonte de células-tronco, a medula óssea hoje praticamente não é mais utilizada no transplante autólogo, sendo largamente substituída pelas células-tronco obtidas do sangue periférico. Desde a década de 1960 já se havia demonstrado a existência de células-tronco circulando no sangue periférico. A quantidade, porém, era insuficiente para a reconstituição da hematopoese após o transplante.<sup>77</sup> No início da década de 1980, demonstrou-se que após tratamento com quimioterapia (ciclofosfamida) ocorre um aumento do número de células-tronco em circulação.<sup>78</sup> Na mesma década, pesquisadores relataram que o uso de fator de crescimento hematopoético expandia de maneira significativa a quantidade de células-tronco hematopoéticas em circulação.<sup>79</sup> Uma série de ensaios clínicos demonstrou posteriormente as vantagens de se utilizar células-tronco do sangue periférico para o transplante autólogo: a recuperação hematopoética (neutrófilos e plaquetas) era mais rápida, assim como o tempo de hospitalização, a necessidade transfusional e os custos totais eram menores.<sup>80,81,82</sup> Existe o risco de, durante a coleta das células-tronco hematopoéticas, serem também coletadas células neoplásicas. Embora seja evidenciada uma alta taxa de contaminação no material coletado, tanto na medula óssea quanto no sangue periférico, a maior parte das recidivas ocorre por persistência da neoplasia no paciente.<sup>83,84</sup>

O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas vem sendo utilizado no tratamento de uma série de neoplasias onco-hematológicas ou não. Para algumas doenças seus resultados são comparáveis ou superiores aos obtidos com transplante alogênico, como o mieloma múltiplo e nos linfomas (Hodgkin e não-Hodgkin agressivos).<sup>85,86,87</sup> Mais recentemente o transplante autólogo também tem sido utilizado para o tratamento de uma série de doenças

auto-imunes (lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, artrite reumatóide) refratárias aos tratamentos convencionais.<sup>88</sup>

### 1.3.4.2 Transplante Alogênico

#### 1.3.4.2.1 Medula Óssea x Sangue periférico

A utilização de CTH provenientes do sangue periférico praticamente substitui o uso de medula óssea nos transplantes autólogos. Já no transplante alogênico, o uso de CTH do sangue periférico apresenta dois inconvenientes principais: a) a necessidade de se utilizar G-CSF em um doador sadio para se mobilizar as CTH para o sangue; b) um risco maior de DECH comparado ao uso de CTH provenientes da medula óssea. Na verdade, o enxerto proveniente do sangue periférico contém em média quatro vezes mais células CD34 e 10 vezes mais linfócitos T que um enxerto proveniente da medula óssea.<sup>89</sup>

Resumidamente, devido ao elevado número de células CD34 do enxerto obtido no sangue periférico, ocorre uma reconstituição hematopoética mais rápida em relação aos transplantes utilizando medula óssea.<sup>80,89-94</sup> A recuperação dos níveis de neutrófilos ocorre de dois a seis dias antes e a recuperação das plaquetas ocorre de cinco a oito dias antes em comparação ao uso de medula óssea.<sup>89</sup> A incidência de DECH aguda parece ser discretamente superior com o uso do sangue periférico; apenas um estudo mostrou diferença significativamente estatística.<sup>80</sup> Porém, diversos estudos demonstram que existe um risco aumentado de DECH crônico quando se usa enxerto proveniente do sangue periférico.<sup>80,91,94</sup> Essa divergência pode ser devida às diferenças qualitativas entre os dois tipos de enxerto, pois a ativação de linfócitos T secretando citocinas do tipo Th1 é responsável pela DECH aguda, ao passo que linfócitos secretando citocinas de perfil Th2 parecem estar implicados na DECH crônica.<sup>89</sup>

A presença de abundantes células T do doador no enxerto proveniente do sangue periférico, com o conseqüente aumento da DECH, pode levar à suposição de que o efeito enxerto contra tumor (ECT) também poderia estar aumentado quando comparado ao transplante utilizando medula óssea. Mesmo que ensaios com camundongos e alguns estudos clínicos sugiram este aumento no efeito ECT, a análise retrospectiva de um estudo<sup>95</sup> e vários outros ensaios clínicos não comprovaram realmente o aumento do efeito ECT.<sup>80,89-94</sup>

A sobrevida após um transplante alogênico de CTH é o resultado de interações complexas. A maioria dos estudos tanto retrospectivo quanto prospectivos contém um número limitado de pacientes com diagnósticos variados, em situações clínicas diversas e com um tempo de acompanhamento ainda curto.<sup>89,95,96</sup>

Em resumo, a sobrevida global entre pacientes transplantados com CTH do sangue periférico ou da medula óssea não é diferente para os pacientes com doenças com baixo risco de recidiva. Para os pacientes com doenças em estágio avançado, parece existir uma vantagem de sobrevida com a utilização de CTH provenientes do sangue periférico. Deve-se evitar usar CTH provenientes do sangue periférico em crianças.<sup>97</sup>

#### **1.3.4.2.2 Medula Óssea x Sangue de Cordão Umbilical**

O primeiro transplante utilizando células-tronco hematopoéticas do sangue de cordão umbilical foi realizado em 1988 no Hospital Saint Louis em Paris numa criança portadora de anemia de Fanconi. A partir deste confirmou-se que as CTH provenientes do sangue placentário podiam ser consideradas como uma fonte eficaz e segura de CTH para transplante.<sup>98</sup>

Desde o princípio levantou-se a hipótese de uma vantagem das CTH do sangue de cordão umbilical sobre as CTH da medula óssea em razão do seu maior potencial de regeneração e menor aloreatividade.<sup>99</sup>

Análises multivariadas mostraram uma diminuição no risco de DECH aguda e crônica nos pacientes que receberam enxerto de sangue de cordão umbilical. A probabilidade de recuperação de leucócitos e de plaquetas no primeiro mês após o transplante com sangue de cordão umbilical era menor em relação aos pacientes que receberam medula óssea.<sup>100</sup>

Resultados<sup>101</sup> mostram que o transplante de CTH empregando sangue do cordão umbilical não aparentado é uma alternativa razoável na ausência de um doador de medula óssea HLA-idêntico nas crianças portadoras de leucemias agudas. O aumento na mortalidade precoce ligada ao transplante com SCU tem como causa provável o retardo na recuperação dos neutrófilos, pois os óbitos ligados às infecções parecem estar aumentados.

O sucesso dos transplantes com doador familiar e a observação da redução das complicações imunológicas no transplante com sangue de cordão umbilical quando comparado ao uso de medula óssea levaram à criação de bancos de sangue de cordão com doadores não aparentados a partir de 1993. As vantagens do sangue de cordão umbilical são a rapidez de se identificar um doador, já que as células estão imediatamente disponíveis, a ausência de agentes infecciosos e a ausência de risco para o doador.<sup>89</sup>

Mais recentemente alguns estudos têm demonstrado que o sangue de cordão umbilical pode ser também uma alternativa para os adultos. Um estudo comparando o transplante utilizando CTH do cordão umbilical e da medula óssea demonstrou que a recuperação de neutrófilos foi mais lenta no grupo que recebeu sangue de cordão umbilical. Por outro lado, a incidência de DECH foi menor para os receptores de SCU. As taxas de DECH crônica, recidiva e sobrevida foram semelhantes entre os dois grupos.<sup>102</sup> Outro estudo demonstrou melhores resultados de sobrevida com o SCU comparado com a medula óssea em adultos.<sup>103</sup>

Estes estudos demonstram que, quando uma unidade de SCU tem quantidade suficientes de células, esta fonte pode ser uma alternativa de transplante para pacientes adultos sem doador HLA compatível localizado nos registros internacionais, porém as unidades armazenadas tem uma quantidade insuficiente de células para um adulto. Uma alternativa para contornar esta

dificuldade seria a utilização de duas unidades de SCU simultaneamente, o chamado transplante com duplo cordão.<sup>101</sup>

#### 1.3.4.2.3 Resultados clínicos do transplante autólogo de medula óssea

##### 1.3.4.2.3.1 Tumores Sólidos

- 1) **Neuroblastoma:** embora haja uma grande sensibilidade do tumor à quimioterapia, ela cura menos de 20% dos pacientes. A maioria deles apresenta-se para transplante com a forma avançada da doença. Mesmo assim, o emprego do TMO melhorou a sobrevida global e a sobrevida livre de doença no neuroblastoma, porém, os resultados foram modestos.<sup>57</sup>
- 2) **Sarcoma de Ewing:** estudo de fase II demonstraram que 25% dos pacientes pediátricos atingem remissão completa com quimioterapia convencional nos estágios avançados. Os resultados com TMO autólogo não demonstram superioridade em relação à quimioterapia convencional.<sup>57</sup>
- 3) **Rabdomiossarcoma:** as taxas de cura situam-se em 20% para os pacientes com doença metastática. Os resultados com transplante de *stem cells* periféricas são desapontadores em tal situação.<sup>57</sup>
- 4) **Câncer de testículo:** esse tipo de tumor tem grande quimiossensibilidade. Em pacientes que não são refratários à cisplatina e que não têm doença extragonadal, existe uma chance de 20% de cura com a quimioterapia. Os fatores prognósticos envolvidos incluem progressão da doença, doença mediastinal e níveis elevados de B-HCG (*human chorionic gonadotrophin*). Os alvos de interesse das investigações do TMO consistem na doença de mau prognóstico não tratada e na primeira recidiva após terapia convencional.<sup>57</sup> Estudo explorou o emprego de altas doses de ciclofosfamida e de ifosfamida em pacientes refratários, e os resultados confirmam uma ótima resposta (50 a 70%), com remissões completas, variando de 13 a mais



de 70%, com 20 a 50% de sobrevida livre de doença em 18 meses de seguimento médio. Tais achados confirmam a utilidade de altas doses de quimioterapia nesta patologia.<sup>57,104</sup>

**5) Câncer de mama:** os ensaios clínicos do *National Cancer Institute* (protocolo PBT1) compararam, de modo randomizado, a sobrevida global, toxicidade e qualidade de vida em mulheres que responderam ao tratamento padrão para a forma metastática e receberam, em seguida, o protocolo STAMP V (ciclofosfamida, tiotepa e carboplatina) e suporte de *stem cell* ou quimioterapia convencional (CMF). Em tal estudo 180 pacientes foram randomizados no grupo de quimioterapia do tipo CMF. Esses dados são os maiores da literatura e não se observaram diferenças na sobrevida e toxicidade dos dois regimes, embora os resultados de qualidade de vida e custos financeiros não tenham sido apresentados.<sup>57</sup> Assim, as melhores candidatas para o TMO autólogo, em câncer de mama, seriam as pacientes com estágios II ou III da doença com mais de 10 gânglios axilares comprometidos pelo tumor. Resultados preliminares de dois estudos, empregando ABMT, são encorajadores e demonstraram sobrevida livre de doença, de 80% em três anos, nesse subgrupo de pacientes.<sup>57,105</sup>

**6) Câncer de ovário:** o grande desafio em tal patologia é a pouca quimiossensibilidade do tumor. Estudos com pacientes selecionados demonstraram uma vantagem para o TMO autólogo.<sup>57</sup> Assim, pesquisadores administraram dois cursos de ciclofosfamida, adriamicina e cisplatina seguidos da infusão de *stem cells* periféricas. Nenhuma doença macroscópica foi observada no seguimento, em 23 pacientes, e a sobrevida foi de 70% em quatro anos comparada com a de 19% do grupo com doença macroscópica.<sup>57,106,107</sup>

#### 1.3.4.2.3.2 Doenças onco-hematológicas

**1) Doença de Hodgkin:** é curável com quimioterapia convencional, na maioria dos pacientes. Porém, o TMO é uma modalidade efetiva para pacientes em recidiva ou de alto risco (estágio IV).<sup>57</sup> A maioria dos

regimes de condicionamento incluem o BCNU (nitrosuréia); entretanto, ela está relacionada com severa toxicidade pulmonar. Não se observou melhora dos resultados com o transplante alogênico. Dos pacientes que recidivam dentro do primeiro ano de tratamento, somente 14% conseguirão sobrevida livre de doença em quatro anos. Dentre aqueles que recidivam após um ano, a sobrevida livre de doença é de 45% com o transplante autólogo de medula óssea.<sup>57,108</sup>

- 2) Leucemia Mielóide Aguda (LMA):** o TMO autólogo para LMA tem sido empregado em vários centros, no mundo. A sobrevida global varia de 45 a 55%.<sup>57</sup> Três grandes estudos demonstram baixa incidência de recidiva em pacientes adultos que se submeteram ao autotransplante.<sup>57</sup> Recente estudo americano não demonstrou melhora na sobrevida entre transplante autólogo, alogênico e quimioterapia convencional em pacientes pediátricos.<sup>57</sup> Muitos esforços têm sido realizados no sentido de avaliar o possível efeito da purificação da medula óssea com derivados da ciclofosfamida.<sup>57,109</sup>
- 3) Leucemia Linfocítica Aguda (LLA):** transplante autólogo de *stem cells* periféricas em pacientes com LLA, em primeira remissão, não oferece vantagens sobre a quimioterapia convencional. Transplante em segunda remissão pode prolongar a sobrevida livre de doença.<sup>57,110</sup>
- 4) Mieloma Múltiplo:** em ensaios clínicos randomizados, de quimioterapia convencional, com TMO, este último demonstrou resultados superiores de sobrevida. Infelizmente, não se observa um *plateau* ao final da curva de sobrevida com o TMO.<sup>57,111</sup>
- 5) Linfomas não-Hodgkin:** somente 30% a 40% dos pacientes curam-se com a terapêutica convencional. Em torno de 10% dos pacientes que recidivam tornam-se livres da doença com a terapêutica convencional. Nos pacientes em primeira recidiva, que obtêm nova remissão, o TMO autólogo é superior (46% versus 12%) à quimioterapia de resgate. O transplante autólogo, usado como consolidação do tratamento, em pacientes com linfoma de grau intermediário, também demonstra resultados superiores à quimioterapia convencional. Os linfomas da zona de manto e os de baixo grau constituem situações especiais. Os

primeiros apresentam sobrevida curta após o diagnóstico e o transplante pouco altera os resultados nos estágios refratários e na segunda remissão. Nos linfomas de baixo grau, principalmente os com reação em cadeia da polimerase (PCR) negativa para o Bcl-2, apresentam sobrevida livre de doença de 50 a 60% em ensaios clínicos iniciais.<sup>57,112</sup>

**6) Leucemia Mielóide Crônica (LMC):** pacientes jovens sem doadores na família e sem doador não aparentado podem beneficiar-se de transplante autólogo com *stem cells* periféricas, principalmente se o enxerto tiver grande quantidade de células Ph1 negativas.<sup>57</sup>

### 1.5.1 Criopreservação de células progenitoras hematopoéticas

A expansão do papel do transplante de CPH em doenças hematológicas, neoplásicas e genéticas, e a propagação dos serviços de transplante têm exigido melhoria na capacitação dos serviços quanto à manipulação e à criopreservação destas células.<sup>113</sup>

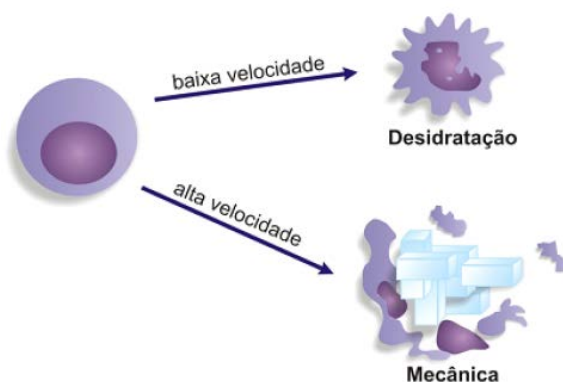
Em geral, a criopreservação de CPH é considerada obrigatória para os transplantes autólogos e para os bancos de sangue de cordão umbilical e placentário (BSCUP), enquanto os transplantes alogênicos geralmente são realizados com a infusão a fresco das CPH, sem sua criopreservação.<sup>113</sup>

#### 1.5.1.1 Princípios da Criopreservação celular

O resfriamento de células a temperaturas pouco superiores a 0°C reduz o seu metabolismo, mas não o abole, de modo que as células continuam a sofrer um processo de deterioração progressiva, apenas em menor velocidade. Além disso, as várias vias metabólicas sofrem heterogeneamente as consequências

das baixas temperaturas, o que, de seu lado, é fator adicional para a perda da viabilidade das células expostas a baixas temperaturas por muito tempo. Os efeitos mais conhecidos do resfriamento são a diminuição da atividade da bomba de sódio, a mudança de fase dos lipídios da membrana (que pode interferir com a função de enzimas) e a precipitação de substâncias (que pode resultar em alteração da composição das soluções e do seu pH).<sup>113</sup>

O sucesso da criopreservação da célula depende da velocidade do congelamento e da composição da solução, onde as células são congeladas. Inicialmente, a água extracelular congela, no momento em que a célula se aproxima do ponto de congelamento, removendo o líquido extracelular, fato que acarreta um aumento de osmolaridade. Com esse desequilíbrio osmótico, a água é retirada da célula para o compartimento extracelular, ocasionando uma diminuição do volume celular. Uma adequada desidratação celular depende da velocidade do congelamento de forma a não provocar uma lise da célula. No caso de um congelamento muito lento, o equilíbrio permanecerá constante e a célula ficará exposta ao crioprotetor e ao estresse osmótico por tempo prolongado, fato que poderá acarretar a morte celular. Ao contrário, no caso de congelamento muito rápido, a desidratação será insuficiente e causará a formação de gelo intracelular ocasionando a lise da célula na ocasião do descongelamento.<sup>113,114</sup> A manutenção da viabilidade da célula submetida ao processo de criopreservação depende basicamente de sua capacidade de resistir a dois tipos de lesão: a desidratação e o dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior (Figura 5).<sup>113</sup> Para evitar o dano celular, mesmo com uma velocidade de descongelamento controlada, há necessidade do emprego de crioprotetores.



**Figura 5:** Tipos de lesão que podem ocorrer durante a criopreservação celular.

Fonte: De Santis GC, Prata KL. Criopreservação de células- progenitoras hematopoéticas. Medicina (Ribeirão Preto) 2009; 42 (1): 36-47.

### 1.5.1.2 Agentes Crioprotetores

O DMSO (Dimetilsulfóxido  $\text{Me}_2\text{SO}$ ) é o crioprotetor mais usado para a criopreservação das CPHs, em geral nas concentrações entre 5 e 10%. A função deste agente parece ser essencialmente coligativa, ou seja, de “captura” das moléculas de água livre, o que leva a redução da quantidade de gelo formada, diminuição da temperatura do ponto de congelamento e aumento do ponto de vitrificação. Esta substância penetra em tecidos e células numa velocidade maior que a do glicerol à temperatura ambiente, o que constitui vantagem apreciável. No entanto, nesta temperatura, o DMSO é mais tóxico que o glicerol, inclusive para as CPHs, o que motivou a maioria dos serviços a estabelecer protocolos que prevêm sua adição lenta à suspensão celular e início do congelamento tão logo tenha terminada a adição.<sup>113</sup> Pesquisa mostrou perda significativa de precursores de granulócitos e macrófagos após incubação da suspensão celular com DMSO.<sup>113,115</sup> Outro estudo analisou unidades de sangue de cordão umbilical expostas ao DMSO e mantidas por tempos progressivos a 4°C e a 37°C, foi observada progressiva perda da capacidade de formação de colônias de GM-CSF, principalmente à temperatura de 37°C.<sup>116</sup>

Como as células são relativamente sensíveis ao chamado estresse osmótico, a adição e a remoção das soluções hipertônicas que contêm os agentes crioprotetores deve ser feita cuidadosamente, de modo a não ultrapassar sua tolerância osmótica. A exposição súbita das células a meios hipertônicos e, posteriormente, isotônicos pode levá-las à ruptura e à perda da viabilidade.<sup>113</sup>

Além do glicerol e do DMSO, há outros agentes crioprotetores, como: propilenoglicol, acetato de trimetilamina, trehalose, hidroxetilamido (HEA) e outros. Particularmente importante dentre eles é o HEA, usado também como expansor da volemia e como agente sedimentante de eritrócitos, empregado para a separação de leucócitos, principalmente para a coleta de granulócitos.<sup>113,117</sup> O HEA é uma macromolécula (há apresentações comerciais

com diferentes pesos moleculares) que tem reduzido efeito osmótico para o seu peso molecular e que não se difunde para o interior das células, sendo por isso denominado de crioprotetor não-penetrante. Os mecanismos crioprotetores do HEA não são plenamente conhecidos, mas envolveria o favorecimento da vitrificação do espaço extracelular e, por isso, em associação com um crioprotetor penetrante, reduziria a intensidade das lesões provocadas pela desidratação celular, e formaria uma camada em torno das células, o que as protegeria da lesão mecânica pelos cristais de gelo formados no espaço extracelular.<sup>113</sup> É possível que a utilização do HEA permita aplicar à suspensão celular velocidade de congelamento menos estrita. Em razão dessas propriedades, este agente tem sido usado principalmente quando do congelamento a temperatura não-programada, como aquela feita em congelador mecânico a 80°C negativos. Problema potencial do emprego de polímeros como o HEA e a polivinil-pirrolidona são os possíveis danos à membrana celular, como demonstrado com hemácias.<sup>113,118</sup>

### **1.3.5.3 Descongelamento e infusão**

O descongelamento de um produto de CPH é feito rapidamente, em geral em banho-maria durante alguns poucos minutos, até o desaparecimento visual dos cristais de gelo.<sup>113</sup> A bolsa com as células deve ser envolta em protetor plástico e imersa em água aquecida a 37-40°C. Para evitar maior risco de contaminação por microrganismos eventualmente presentes na água do banho-maria, pode-se tratá-la com antisséptico iodado, ou então proceder ao descongelamento a seco, que oferece recuperação semelhante ao método mencionado acima.<sup>113,119</sup>

A infusão de CPHs criopreservadas tem sido associada a reações adversas, em sua maioria leves e de curta duração. Entretanto, reações mais graves foram relatadas.<sup>113</sup> Essas reações são atribuídas à infusão de DMSO, de restos celulares e ao conteúdo de células não-mononucleares presente no produto.<sup>113,120</sup> A maioria dos pacientes apresenta náusea, calafrios, sensação desagradável em orofaringe e, mais raramente, hipotensão, dispnéia e arritmias cardíacas.<sup>113,121,122</sup> O DMSO pode induzir a liberação de histamina, o

que explicaria a hipotensão e as reações anafiláticas que já foram associadas à sua infusão.<sup>113</sup>

Uma alternativa para a profilaxia das reações adversas pode ser a lavagem da suspensão celular, que visa remover a maior parte do DMSO, da hemoglobina livre e dos restos celulares. Este procedimento pode ser feito pelo emprego de técnicas semi-automatizadas (procedimento trabalhoso e demorado) ou automatizadas (resulta em maior dispêndio de recursos financeiros) com o auxílio de lavadoras de células.<sup>113,123-125</sup>

Por causa das reações adversas acima mencionadas, a maioria dos serviços preconiza a administração profilática de medicamentos, dentre os quais anti-histamínicos e corticosteróides, antieméticos e antipiréticos. Além disso, e para diminuir a toxicidade potencial da hemoglobina livre, é recomendada hidratação vigorosa no dia da infusão das células. Eventualmente, em casos especiais, quando houver alta probabilidade de ocorrência de sobrecarga volêmica (infusão de medula óssea), pode ser necessário o uso de diuréticos.<sup>113</sup>

#### **1.4 Complicações infecciosas no transplante de Células-tronco hematopoéticas**

O transplante de medula óssea é uma modalidade terapêutica que vem sendo cada vez mais usada no tratamento de doenças hematológicas malignas e não-malignas, tumores sólidos e doenças genéticas e metabólicas.

Infeção e a doença enxerto contra hospedeiro continuam sendo a principal causa de morbidade e mortalidade nestes pacientes. O período de neutropenia, que em geral compreende os primeiros 30 dias de internação, é o de maior vulnerabilidade à estas complicações.<sup>126</sup>

As infecções bacterianas predominam no período de neutropenia e seu perfil vem sofrendo alterações devido a vários fatores, como o emprego de antibióticos mais efetivos e à melhora das condições de suporte. Houve, como consequência, mudança em relação aos agentes etiológicos das infecções bacterianas, com predomínio das infecções causadas por bactérias gram-positivas em relação aos germes gram-negativos.<sup>126</sup> Nos anos 70 e 80,

pacientes neutropênicos eram mais freqüentemente colonizados e infectados por bacilos gram-negativos <sup>126,127</sup>. Na última década, entretanto, houve um declínio na incidência destas infecções, devido à melhora da antibioticoterapia para estes agentes, associado ao aumento da faixa etária dos pacientes e a resistência aos agentes beta lactâmicos. Do mesmo modo, notou-se uma mudança no perfil microbiológico dos agentes que causam infecção neste grupo de pacientes, com aumento das infecções estafilocócicas - principalmente àquelas atribuídas ao *Staphylococcus epidermidis* - relacionadas ao uso permanente de cateter venoso central.<sup>126</sup>

Esforços no sentido de diminuir o risco de contaminação incluem normas rígidas em relação à higiene da equipe que assiste ao paciente, cuidados com dieta e água do paciente, isolamento em quarto com fluxo de ar laminar e realização de culturas de vigilância. Embora apresentem papel controverso e custo elevado, para alguns autores as culturas de vigilância são essenciais para detectar aquisição de germes resistentes e possibilitar ajustes na profilaxia com antibióticos.<sup>126</sup>

#### 1.4.1 Os tipos de transplante e o risco de infecção

Vários **fatores predisponentes**, relacionados à doença de base, aos tipos e às complicações do transplante de CTH influenciam o perfil das infecções que acometem os pacientes submetidos ao procedimento. Antes do transplante, pode haver **diferenças nas doenças de base**, por exemplo, pacientes com anemia aplástica, que vão receber transplante alogênico, apresentam neutropenia acentuada, ao passo que pacientes com doença de Hodgkin, que sejam candidatos a transplante autólogo, apresentam defeito importante na imunidade celular, mas não neutropenia. Entretanto, após o tratamento com quimioterapia ou radioterapia intensa, seja no condicionamento do transplante ou antes dele, o sistema imunológico é afetado como um todo, e essas diferenças atenuam-se ou desaparecem. Há importantes **diferenças entre os transplantes alogênico e autólogo** em termos de imunodepressão. Assim, no transplante alogênico, as células progenitoras, infundidas de um



doador, são imunologicamente competentes, ao passo que as células do paciente infundidas no transplante autólogo carregam a imunodepressão da doença de base. Além disso, a transferência passiva de anticorpos é mais adequada no transplante alogênico. Já a **pega do enxerto** costuma ser mais rápida no transplante autólogo, especialmente se a fonte de células tronco for do sangue periférico, com conseqüente duração menor da neutropenia. Para complicar ainda mais, no transplante alogênico, pode haver rejeição do enxerto e, no transplante autólogo, pode haver retardo ou falha na enxertia, principalmente quando a doença de base não é bem controlada. Outra diferença do transplante alogênico em relação ao autólogo é que no alogênico são administradas precocemente drogas imunossupressoras para prevenção ou tratamento da doença do enxerto- contra-o-hospedeiro, o que aumenta sobremaneira o risco de infecções, especialmente aquelas decorrentes da supressão da imunidade celular. Esse quadro pode se prolongar, se o paciente desenvolve a doença crônica do enxerto-contra-o-hospedeiro, quando infecções bacterianas por germes encapsulados, dependentes de mecanismo de defesa humorais, também se tornam comuns.<sup>128</sup>

#### **1.4.2 A fase de aplasia: neutropenia- o primeiro desafio**

As complicações infecciosas, nesse período, são muito semelhantes àquelas que ocorrem em pacientes em indução de remissão de leucemia aguda, em que a quimioterapia ablativa resulta em neutropenia profunda e mucosite grave. No período inicial de neutropenia, o paciente fica em risco de desenvolver bacteremias por enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* sp. do grupo *viridans* e *Staphylococcus* sp. coagulase negativa. Esses germes respondem por mais de 90% das bacteremias em pacientes transplantados de medula óssea<sup>128,129</sup> e, na maioria dos centros de transplante na Europa e na América do Norte, as bactérias gram-positivas são responsáveis por mais de 80% das bacteremias. No Brasil, em estudo recentemente concluído, foram analisados os episódios infecciosos de 87 transplantes autólogos de quatro instituições: USP-Ribeirão Preto, UNICAMP, INCa e UFRJ. Apenas seis pacientes não desenvolveram febre durante o período de neutropenia, enquanto, nos outros 81 pacientes, 45% dos episódios

de febre e neutropenia não tiveram documentação de infecção (febre de origem obscura), quatro (5%) tiveram documentação microbiológica excluindo a corrente sangüínea, 10 (12%) tiveram documentação clínica e 31 (38%) tiveram infecção na corrente sangüínea. Dos 31 episódios, as bactérias Gram-positivas predominaram (20 episódios, 65%) e bactérias Gram-negativas foram documentadas em 11 episódios (35%). Em três episódios havia mais de um germe nas hemoculturas (dois casos com mais de um Gram-negativo e um caso com um Gram-positivo e *Candida sp.*). Entretanto, a proporção de casos Gram-negativos variou em cada instituição: 4/5 (80%) na USP-Ribeirão Preto, 2/9 (22%) na UNICAMP, 3/6 (50%) no INCa e 2/11 (18%) na UFRJ-Rio de Janeiro. Assim, ocorrem variações importantes na etiologia das infecções, nas diferentes instituições, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo uso de quinolonas na profilaxia antibacteriana. De fato, nas quatro instituições, houve diferenças marcantes na proporção de pacientes submetida a tal profilaxia: 0% no INCa e na UFRJ, 55% na USP Ribeirão Preto e 100% na UNICAMP. No transplante alogênico, os dados de dois centros brasileiros (USP Ribeirão Preto e UFPR-Curitiba) sugerem que, entre as infecções precoces pós-TMO predominam as causadas por bactérias Gram-positivas (2/3 de Gram+ em 154 culturas positivas, na USP-RP e 60% de Gram+ entre 136 culturas positivas, na UFPR).<sup>128</sup>

As infecções por bactérias Gram-negativas, em geral, se originam do tubo gastrointestinal, já os estafilococos de coagulase negativa têm como porta de entrada predominante os cateteres venosos profundos. A bacteremia por *Streptococcus* se origina da orofaringe e os pacientes, quase invariavelmente, apresentam mucosite, que, com frequência, se complica por reativação de herpes simples, facilitando a entrada dos estreptococos, cuja bacteremia pode se acompanhar de insuficiência respiratória e óbito <sup>130</sup>. Se o paciente continua neutropênico além de uma semana, o risco de desenvolver superinfecções aumenta, algumas delas em locais específicos, causando, por exemplo, sinusite, pneumonia ou tífite.

### 1.4.3 Uso de antibióticos em receptores de TCTH

Considerando os riscos e epidemiologia das infecções bacterianas em TCTH, diferentes estratégias de uso de antibióticos têm sido empregados. Estes incluem o uso de antibióticos como profilaxia, terapia empírica, e tratamento das infecções documentadas.

#### 1.4.3.1 Antibioticoprofilaxia

##### - Período pré-enxerto

O uso profilático de agentes antimicrobianos tem sido extensivamente estudado em pacientes neutropênicos. Bacteremias originadas por gram-negativos podem causar infecções potencialmente fatais em receptores de TCTH, durante este período as quinolonas foram considerados os agentes de escolha. De fato, nos últimos 15 anos, vários estudos têm avaliado a eficácia desses agentes, e documentou uma redução significativa na incidência de bactérias gram-negativas em infecções bacterianas.<sup>131</sup> Porém, a profilaxia das quinolonas não resultou em uma redução da duração da febre e, mais importante, da mortalidade relacionada à infecção. No entanto, uma limitação ainda maior para o uso de quinolonas na profilaxia de infecções bacterianas durante o período pré-enxerto do transplante é o aparecimento de resistência a estas.<sup>132-134</sup> Em um estudo dos padrões de sensibilidade bacteriana aos antibióticos em receptores de TCTH, a frequência de resistência às quinolonas entre bactérias gram-positivas e gram-negativas (especialmente Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa*) aumentou significativamente após a introdução desses agentes no esquema profilático.<sup>135</sup> Em outro estudo que avaliou a incidência e a suscetibilidade de isolados de sangue durante sete anos em unidade TCTH, os estreptococos foram os microrganismos mais frequentes causadores de infecções, e o aumento de resistência à penicilina, ciprofloxacina e imipenem também foi observada entre estes organismos.<sup>136</sup> Embora a profilaxia antibacteriana (principalmente ciprofloxacina) foi associado a uma redução na incidência de infecção, este resultou em um aumento da resistência a antibióticos b-lactâmicos. O uso generalizado das quinolonas

também tem sido associada com um aumento significativo na resistência a estas pelo *Staphylococcus* coagulase-negativo.<sup>137</sup>

Curiosamente, observou-se uma reversão de suscetibilidade de *Escherichia coli* às quinolonas, depois de interrompida a sua utilização na profilaxia de pacientes neutropênicos. Entre 1992 e 1997, as quinolonas foram usadas em 43% dos 420 episódios de febre e neutropenia, mas em apenas um dos 433 episódios entre 1998 e 2001. A frequência de bacteremia causado por gram-negativos e gram-positivos foram semelhantes nos dois períodos, mas a frequência de bacteremia por *E.coli* quinolona- resistente foi de 60% no período 1 e 6% no período 2 ( $p = 0,02$ ).<sup>138</sup> Portanto, embora o uso de quinolonas na profilaxia de infecções bacterianas é rotina em muitos centros de transplante, seu uso deve ser reavaliado, considerando os riscos de indução de resistência. Recentemente foi publicado um guia para a prevenção de infecção em receptores de TCTH e tal não recomenda o uso rotineiro de profilaxia antibacteriana, com um nível "DIII" de evidência (evidência moderada diante a eficácia, com comprovação a partir de opiniões de autoridades respeitadas, baseadas na experiência clínica, estudos descritivos, ou relatórios de comitês de especialistas). Recomenda-se também que, se os médicos na escolha do uso de antibióticos profiláticos, estes devam rotineiramente revisar os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos do hospital e centro de TCTH.<sup>139</sup>

Outra estratégia que tem sido amplamente utilizada em muitos centros de TCTH é utilizar antibióticos b-lactâmicos por via intravenosa em pacientes neutropênicos afebril. Embora esta estratégia possa estar associada a uma ligeira redução na incidência de infecção<sup>140</sup>, ela tem um enorme impacto negativo sobre o aparecimento de resistência. Em um estudo que avaliou a suscetibilidade bacteriana em um período de 7 anos em uma unidade de TCTH<sup>136</sup>, a frequência do uso de antibióticos beta-lactâmicos em pacientes afebril aumentou de menos de 10% em 1991 para 57% em 1997. Embora o imipenem nunca tinha sido usado para esta finalidade e sua utilização permaneceu em constante baixa (apenas 14% dos pacientes) durante o período do estudo, a frequência de resistência estreptocócica a este agente aumentou de zero antes de 1996 para 25% em 1996 e 1997. Considerando

que betalactâmicos são a principal classe de antibióticos utilizados na terapêutica empírica de antibióticos (uma estratégia que resulta em uma redução significativa na mortalidade), o aparecimento de resistência aos antibióticos b-lactâmicos é claramente uma grande preocupação. O uso de cefalosporinas de terceira geração também tem sido associada com um aumento na frequência de organismos gram-negativos produtores de betalactamase de espectro ampliado (ESBL).<sup>141</sup> Portanto, o uso de antibióticos b-lactâmicos para pacientes neutropênicos afebris não possui nenhuma base científica e deve ser fortemente desencorajado.

A profilaxia de infecções contra bactérias gram-positivas também tem sido estudada tanto com agentes com administração por via oral quanto por via intravenosa. Em um estudo em receptores de TCTH, os pacientes foram randomizados para receber ciprofloxacina com ou sem vancomicina intravenosa. Não foram observados diferença significativa na frequência de bacteremias.<sup>142</sup> Em outro estudo randomizado, o uso de vancomicina resultou em uma redução significativa na frequência de infecções por bactérias gram-positivas, duração da febre e uso de antibióticos.<sup>143</sup> Considerando os resultados controversos desses estudos e, mais importante, o impacto da utilização de vancomicina no desenvolvimento de resistência de bactérias gram-positivas, especialmente *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), seu uso não é justificável.

Agentes orais, tais como a penicilina, macrolídeos ou vancomicina, também têm sido utilizados como profilaxia em pacientes neutropênicos. Em um estudo randomizado, os pacientes receberam pefloxacina mais penicilina (268 pacientes) ou placebo (268 pacientes).<sup>144</sup> A frequência de febre e bacteremia por gram-positivos foi significativamente maior no grupo do placebo. No entanto, 14 pacientes no grupo de penicilina desenvolveu bacteremia estreptocócica, e 46% das amostras eram resistentes à penicilina.

A resistência à penicilina tem sido cada vez mais relatada entre os estreptococos isolados de receptores de TCTH<sup>136</sup> e esta associado com o uso da penicilina. Isto é particularmente importante porque: a) a frequência de bacteremia por *Streptococcus viridans* aumentou na última década; b) a

bacteremia por *Streptococcus viridans* ocorre em pacientes com mucosite grave, e pode estar associada a um quadro clínico rapidamente fatal com insuficiência respiratória e choque, e c ), a maior taxa de resistência à penicilina, o mais freqüente é o uso empírico da vancomicina em pacientes com mucosite grave.

Considerando-se o benefício marginal e estas preocupações, o papel da profilaxia anti-bactérias gram-positivas devem ser questionados. Na verdade, uma meta-análise que avaliou a utilidade da profilaxia anti-gram-positivos em pacientes com neutropenia, mostrou que embora tenha havido uma redução significativa na freqüência de infecção por estas bactérias, não houve benefício em termos de morbidade relacionada com febre ou mortalidade relacionada à infecção.<sup>145</sup>

#### **- Período pós-enxerto**

A profilaxia anti-bacteriana normalmente não é usada no início da fase pós-enxerto, porque o risco de infecção é baixo. Na fase tardia do pós-enxerto há aumento do risco de infecção por bactérias encapsuladas, sendo o risco proporcional à gravidade e duração da DECH crônica. A penicilina oral ou sulfametoxazol-trimetoprim tem sido dada a esses pacientes e seu uso é geralmente aceito, embora não existam estudos clínicos controlados que suportam esta recomendação. Nas orientações para a prevenção de infecção em receptores de TCTH<sup>139</sup>, é recomendado que estes antibióticos sejam utilizado em pacientes com DECH crônica. O tratamento para DECH é administrado, com um nível "BIII" de evidência (evidência forte ou moderada de eficácia, comprovada a partir de opiniões de autoridades respeitadas baseadas na experiência clínica, estudos descritivos ou relatórios de comitês de especialistas). Esta situação é muito diferente da profilaxia antibiótica durante a neutropenia. A profilaxia durante o período neutropênico não tem impacto na sobrevida desde que a terapia empírica com antibióticos seja iniciada depois que o paciente torna-se febril, afim de evitar-se bacteremia pneumocócica que pode ser fatal.

Portanto, as conseqüências da não intervenção sobre o excesso relacionado ao uso crônico de penicilina seja o desenvolvimento de resistência a mesma. No entanto, os médicos devem estar cientes de que a resistência se correlaciona com a duração da profilaxia.

#### 1.4.3.2 A antibioticoterapia empírica

A antibioticoterapia empírica é padrão no tratamento do paciente neutropênico febril desde o início dos anos 80. Esta estratégia resultou em uma redução significativa na taxa de morte precoce. Nos últimos 20 anos um grande número de ensaios clínicos randomizados têm comparado diferentes esquemas de antibióticos e estratégias de terapia empírica. Em geral, nenhum esquema mostrou-se superior em termos de sucesso com ou sem modificações do esquema empírico ou no índice de mortes. Com a introdução dos antibióticos com boa atividade anti-pseudomonas, a prática de monoterapia aumentou na última década. De acordo com as diretrizes recentemente publicadas para a utilização de antibióticos em pacientes neutropênicos, os antibióticos aceitos para serem utilizados na monoterapia são ceftazidima (cefalosporina de terceira geração), cefepime (cefalosporina de quarta geração), e os carbapenêmicos (meropenem ou imipenem).<sup>146</sup> Além disso, piperacilina-tazobactam, uma penicilina *anti-Pseudomonas*, é igualmente eficaz.<sup>147</sup>

A primeira consideração na escolha do esquema antibiótico a ser dado empiricamente para receptores de TCTH neutropênicos é o conhecimento do tipo, freqüência e sensibilidade aos antibióticos de bactérias isoladas que predominam no hospital. Em outras palavras, os padrões de distribuição de freqüência e suscetibilidade de uma unidade de transplante são um reflexo do que acontece no hospital como um todo. Instituições com alta freqüência de enterobactérias produtoras de ESBL provavelmente devem evitar as cefalosporinas de terceira geração do esquema empírico, mesmo que isso funcione (e, geralmente, funciona) para a maioria dos pacientes nessa unidade.<sup>141</sup>

Por outro lado, o aparecimento de bactérias com baixa patogenicidade, como *Acinetobacter* spp. e *Stenotrophomonas maltophilia* é uma preocupação<sup>136,148</sup>, e pode estar associada com o uso difundido de antibióticos com espectro muito amplo de atividade, como os carbapenêmicos.<sup>149</sup> No entanto, como a *P. aeruginosa* é ainda a bactéria associada com a maior mortalidade entre os receptores de TCTH neutropênicos<sup>136</sup>, a escolha do esquema empírico deve predominantemente levar em conta os perfis de suscetibilidade desta bactéria em uma instituição. Portanto, o esquema deve ser muito ativo contra a *P. aeruginosa*, porém esta estratégia com o uso de determinado antibiótico pode ocasionar o desenvolvimento de resistência. Isto é particularmente real para os carbapenêmicos, pois seu uso está associado ao aparecimento de cepas multi-resistentes de *P. aeruginosa*<sup>150</sup>, particularmente em indivíduos imunodeprimidos.<sup>151</sup> A utilização de carbapenêmicos é também um fator de risco para o surgimento de candidíase em pacientes neutropênicos.<sup>152</sup> Além do uso criterioso de antibióticos durante a neutropenia, todos os esforços para controlar a transmissão horizontal e disseminação de microrganismos resistentes na unidade de TCTH é fundamental, pois a presença de bactérias resistentes tem sido relatada em unidades de transplante.<sup>153</sup>

Glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) têm sido utilizados em pacientes neutropênicos febris, seja inicialmente ou na persistência da mesma. O argumento mais forte que favorece o uso desses agentes em regime inicial é a possibilidade que o paciente desenvolva bacteremia, por isolados de *Streptococcus viridans* penicilina-resistente, uma vez que a bacteremia, devido a esses agentes pode ser fatal. Por outro lado, são muitos os argumentos contra a sua utilização, incluindo a toxicidade e o aparecimento de resistência. O uso de vancomicina tem sido associada com o desenvolvimento de infecções causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativo glicopeptídeo-resistente,<sup>154</sup> *Staphylococcus* coagulase-positiva com sensibilidade intermediária aos glicopeptídeos (GISA- "glycopeptide- intermediate *Staphylococcus aureus*")<sup>155</sup> e *Candida*.<sup>152</sup>

No entanto, o maior problema relacionado ao uso excessivo de vancomicina foi a aparição mundial de VRE (Vancomycin-resistant



*Enterococcus*).<sup>156</sup> Devido à estreita associação entre o uso de vancomicina e VRE, o IDSA ( Infectious Diseases Society of America) publicou orientações para o uso de antimicrobianos em pacientes neutropênicos, recomendando que a vancomicina seja utilizada no esquema antibiótico empírico inicial apenas nas seguintes situações: suspeita clínica de graves infecções relacionadas com a colonização de cateter, com isolados resistentes (pneumococos penicilina e cefalosporina resistentes ou *S.aureus* metilina-resistente (MRSA)), resultados positivos de hemocultura para bactérias gram-positivas antes da identificação final e provas, ou hipotensão.<sup>146</sup> Em relação ao *Streptococcus viridans*, embora a resistência à penicilina tenha aumentado, os antibióticos como a cefepime, piperacilina-tazobactam e carbapenêmicos possuem uma boa atividade contra a maioria das cepas. Além da exclusão da vancomicina na terapia antibiótica empírica inicial na maioria dos casos, a adição empírica de vancomicina após 2 ou 3 dias de febre persistente não é recomendada, a menos que qualquer um dos critérios mencionados acima esteja presente.<sup>146</sup> Os VREs têm sido descritos em receptores de TCTH,<sup>157</sup> e o aparecimento de VREs em uma unidade de transplante deve ser evitado. Portanto, o uso empírico da vancomicina deve ser restrito.

### **1.5 Contaminação bacteriana de produtos de *stem cell***

A contaminação bacteriana de células hematopoéticas do sangue periférico para utilização em transplante autólogos de medula óssea ocorre esporadicamente. A obtenção, o processamento, o armazenamento e o próprio transplante do produto envolvem várias etapas que normalmente são realizadas em diferentes locais e ambientes. A manipulação do produto de CPHSP durante o processamento e o período pré e pós-criopreservação constituem uma fonte potencial de contaminação bacteriana nestas células.<sup>158</sup> Outras fontes potencialmente contaminantes dos produtos de CPHSP podem ser: reagentes, acesso venoso através de cateteres, falha na assepsia, processamento dessas células, rompimento das bolsas, equipamentos utilizados como banho-maria, incubadoras e centrífugas.<sup>158,159,160,161,162,163,164-173</sup>

No que se refere à contaminação microbiológica de CPHSP, estudos têm demonstrado que:

- Algumas espécies de bactérias e fungos podem sobreviver à criopreservação;
- Comumente a contaminação ocorre por espécies de bactérias que fazem parte da microbiota normal da pele;
- O risco de contaminação microbiana e as taxas de contaminação variam de 0 a 4,5%.<sup>160-163,174-177</sup>

A Food and Drug Administration (FDA) estimou que eliminando o risco de contaminação de CPHSP evitariam-se sete mortes anuais devido a infecções.<sup>178</sup>

As infecções são a principal causa de mortalidade e morbidade em transplantados, seja em transplante de medula óssea (TMO) ou de CPHSP, pois estes pacientes têm sua imunidade humoral e celular debilitada.<sup>179</sup> Apesar da utilização de técnicas estéreis durante a coleta e o processamento desses produtos, a contaminação bacteriana pode ocorrer. Estes produtos devem ser administrados apenas com o consentimento informado do paciente e com a aprovação do médico. Orientações pormenorizadas para infusão de CPHSP contaminadas não estão disponíveis, mas várias diretrizes foram estabelecidas para impedir ou detectar a contaminação microbiana desses produtos. O guia de Boas Práticas de Fabricação (BPF) da União Européia descreve as condições gerais, instalações, equipamentos, documentação e controle de qualidade de componentes de sangue. Regulamentos similares estão disponíveis através da Food and Drug Administration (FDA), American Association of Blood Banks (AABB) e Foundation for the Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy (FAHCT).

## **2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

Considerando que a maioria dos estudos sobre a contaminação microbiana de produtos *stem cells* foram realizados em hospitais no exterior, principalmente em hospitais terciários do primeiro mundo, torna-se necessário o conhecimento dos níveis e das principais características da contaminação e processamento desses produtos em hospitais brasileiros.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo geral levantar a incidência de culturas microbianas positivas dos produtos de Células Progenitoras Hematopoéticas do Sangue Periférico (CPHSP) no período que compreende os anos de 2000 a 2009 no Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **3.2 Objetivo Específico**

Investigar as principais bactérias contaminantes do produto de CPHSP, volume e tempo da coleta, antibioticoterapia realizada pré e pós- infusão dessas células contaminadas, o perfil clínico dos pacientes que realizam este tipo de coleta, taxa de contaminação anual, avaliação de culturas pós-descongelamento do produto e os produtos de CPHSP contaminados que, por decisão médica, foram descartados ou infundidos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Watt FM, Hogan BLM. Out of the Eden: stem cells and their niches. *Science*, 2000; 287: 1427-1430.
2. Berná G, León-Qumto T, Enseiat-Waser R, Montanya E, Martín F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed. Pharmacother*, 2001; 55: 206-212.
3. Abdelhay ESW, Braga FHP, Binato R, Bouzas LFS. Células-tronco de origem hematopoética: expansão e perspectivas de uso terapêutico. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 2009; 31: 2-8.
4. Seydoux G, Braun RE. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell*, 2006; 127(5): 891-904.
5. Xu R, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20: 1261-1264.
6. Gilbert SC, *Developmental Biology*. In: Gilbert, S.C. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. 2003. p. 4106-4130.
7. Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Ed. Atheneu, 2006; p.4.
8. Sun Y, Li H, Yang H, Rao MS, Zhan M. Mechanisms controlling embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Crit Ver Eukaryot Gene Expr*. 2006; 16(3): 211-31.
9. Avery S, Inniss K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2006; 15(5): 729-40.
10. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenish R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor- cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005; 121: 465-77.
11. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000; 18: 399-404.
12. Przyborski SA. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immunodeficient mice. *Stem cells*. 2005; 23: 1242-1250.
13. Draper SJ, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultures human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2004; 22:53-4.

14. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *New England J Med* 2004; 350: 1353-6.
15. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassauei K *et al.* Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genet.* 2005; 37(10): 1099-1103.
16. Larson JS, Yin M, Fischer JM, Stringer SL, Stringer JR. Expression and loss of alleles in cultured mouse embryonic fibroblasts and stem cells carrying allelic fluorescent protein genes. *BMC Molecular Biology.* 2006; 7:36.
17. Brasil. Lei 11.105, de 24 de março de 2005. Lei de Biossegurança. *Diário Oficial da União, Brasília*, p1, col. 3, 28 de março de 2005.
18. Clarke DL. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288: 1660-1663.
19. Horwitz EM. Stem cell plasticity: a new image of the bone marrow stem cell. *Curr Opin pediatr.* 2003; 15(1): 32-7.
20. Chiu C. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human marrow. *Stem Cells* 1996; 14: 239-248.
21. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193-204.
22. De Souza VF, Lima LMC, Reis SRA, Ramalho LMP, Santos JN. Células-tronco: uma breve revisão. *R. Ci. Méd. Biol.* 2003; 2: 251-256.
23. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res.* 2003; 34(6): 461-75.
24. Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Ed. Atheneu, 2006; p.49.
25. Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959; 38: 1709-16.
26. Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S *et al.* Eurocord Transplant Group. Related umbilical Cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 2003; 101(6): 2137-43.

27. Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Ed. Atheneu, 2006; p.52.
28. Sutherland DR, Stewart AK, Keating A. CD34 antigen:molecular features and potential clinical applications. *Stem Cells* 1993; 11(3): 50-7.
29. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, *et al.* CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996; 87: 1-13.
30. Ratajczak MZ, Gewirtz AM. The biology of hematopoietic stem cells. *Semin Oncol* 1995; 22: 210-7.
31. Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. CD34+ or CD34-: which is the more primitive? *Leukemia*. 2002; 16(9): 1603-8.
32. Lu X, Baudouin SV, Gillespie JI, Anderson JJ, Dickinson AM. A comparison of CFU-GM, BFU-E and endothelial progenitor cells using ex vivo expansion of selected Cord blood CD133+ and CD34+ cells. *Cytotherapy* 2007; 9(3): 292-300.
33. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34- Lin- and CD34+ Lin- hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000; 95(9): 2813-20.
34. Ruzicka K, Grskovic B, Pavlovic V, Qujeq D, Karimi A, Mueller MM. Differentiation of human umbilical Cord blood CD133+ stem cells towards myelo-monocytic lineage. *Clin Chim Acta* 2004; 343(1-2): 85-92.
35. Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Ed. Atheneu, 2006; p53.
36. Goodell MA, Brose K, Paradis G *et al.* Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-806.
37. Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC *et al.* Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* 2004; 20:87-93.
38. Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 1995; 51:914-26.
39. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hematopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992; 49:225-33.
40. Mayani H. Composition and function of the microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1041-7.

41. Williams DA. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells- Robbing Peter to pay Paul? *Blood* 1993; 81: 3169-72.
42. Gupta P, McCarthy JB, Verfaillie CM. Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells. *Blood* 1996; 87:3229-36.
43. Gordon MY, Lewis JL, Marley SB *et al.* Stromal cells negatively regulate primitive haemopoietic progenitor cell activation via a phosphatidylinositol-anchored cell adhesion/signalling mechanism. *Br J Haematol* 1997; 96: 647-53.
44. Krause D, Cantley LG. Bone marrow plasticity revisited: protection or differentiation in the kidney tubule? *J Clin Invest* 2005; 115: 1705-8.
45. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4080-5.
46. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-30.
47. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
48. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-70.
49. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R *et al.* Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-6.
50. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A *et al.* Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; 105: 71-7.
51. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI *et al.* From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-9.
52. Mezey E, Chandross KJ, Harta G *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-82.
53. Priller J, Persons DA, Klett FF *et al.* Neogenesis of cerebellar purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 2001; 155: 733-8.
54. Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 1-22.

55. Nardi NB, Alfonso ZZ. The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 601-9.
56. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous- that is the question. *Exp Hematol* 2005; 33: 613-23.
57. Massumoto C, Mizukami S. Transplante autólogo de medula óssea e imunoterapia pós-transplante. *Medicina, Ribeirão Preto* 2000; 33: 405-414.
58. Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Ed. Atheneu, 2006; p118.
59. Azevedo W, Ribeiro MCC. Fontes de células-tronco hematopoéticas para transplantes. *Medicina, Ribeirão Preto* 2000;33: 381-389.
60. Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Ed. Atheneu, 2006; p119.
61. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J *et al.* Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical Cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1994; 22: 215-22.
62. Steen R, Tjonnfjord GE, Egeland T. Comparison of the phenotype and clonogenicity of normal CD34+ cells from umbilical Cord blood, granulocyte colony stimulating factor- mobilized peripheral blood, and adult human bone marrow. *J Hematother* 1994; 3:253-62.
63. Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993; 178: 787-91.
64. Rocha V, Carmagnat MV, Chevret S *et al.* Influence of bone marrow graft lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants . *Exp Hematol* 2001; 29: 1347-52.
65. Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD *et al.* Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood* 1985; 66: 664-72.
66. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 702-9.
67. Tayebi H, Kuttler F, Saas P *et al.* Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells. *Exp Hematol* 2001; 29: 458-70.
68. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:358-63.



69. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW *et al.* Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 307-16.
70. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363: 1439-41.
71. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N *et al.* Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004; 89: 1421-7.
72. Broxmeyer HE. Biology of Cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit. *Cytotherapy* 2005; 7: 209-18.
73. Kogler G, Sensken S, Airey JA *et al.* A new human somatic stem cell from placental Cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004; 200: 123-35.
74. Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Ed. Atheneu, 2006; p123.
75. Gorin NC, Najman A, David R *et al.* High dose combination chemotherapy with and without autologous bone marrow transplantation in patients with solid tumors and acute leukemias. Kinetics of recovery of peripheral blood cells (author's transl). *Nouv Presse Med* 1978; 7: 105-10.
76. Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL *et al.* Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978; 52: 85-95.
77. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I *et al.* Stem cell mobilization. *Hematology* 2003; 419-37.
78. Abrams RA, McCormack K, Bowles C *et al.* Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs. *J Clin Invest* 1981; 67:1392-9.
79. Socinski MA, Cannistra SA, Elias A *et al.* Granulocyte macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988; 1: 1194-8.
80. Schmitz N, Linch DC, Dreger P *et al.* Randomised Trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996; 347: 353-7.

81. Brunvand MW, Bensinger WI, Soll E *et al.* High-dose fractionated total-body irradiation, etoposide and cyclophosphamide for treatment of malignant lymphoma: comparison of autologous bone marrow and peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 131-41.
82. Smith TJ, Hillner BE, Schmitz N *et al.* Economic analysis of a randomized clinical Trial to compare filgrastin-mobilized peripheral-blood progenitor-cell transplantation in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 5-10.
83. Kanteti R, Miller K, McCann J *et al.* Randomized Trial of peripheral blood progenitor cell VS bone marrow as hematopoietic support for high-dose chemotherapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease: a clinical and molecular analysis. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 473-81.
84. Narayanasami U, Kanteti R, Morelli J *et al.* Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation. *Blood* 2001; 98: 2059-64.
85. Chopra R, Goldstone AH, Pearce R *et al.* Autologous versus allogeneic bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case-controlled analysis of the European Bone Marrow Transplant Group Registry data. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1690-5.
86. Milpied N, Fielding AK, Pearce RM *et al.* Allogeneic bone marrow transplant is not better than autologous transplant for patients with relapsed Hodgkin's disease. *European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. J Clin Oncol* 1996; 14:1291-6.
87. Alyea E, Weller E, Schlossman R *et al.* Outcome after autologous and allogeneic stem cell transplantation for patients with multiple myeloma: impact of graft-versus-myeloma effect. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 1145-51.
88. Gratwohl A, Passweg J, Bocelli-Tyndall C *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35:869-79.
89. Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina- São Paulo: Ed. Atheneu, 2006; p124,126.
90. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B *et al.* Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-bloods cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001; 344:175-81.

91. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C *et al.* Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol* 2000; 18: 537-46.
92. Heldal D, Tjonnfjord G, Brinch L *et al.* A randomised study of allogeneic transplantation with stem cells from blood or bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 1129-36.
93. Powles R, Mehta J, Kulkarni S *et al.* Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 1231-7.
94. Vigorito AC, Azevedo WM, Marques JF *et al.* A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 1145-51.
95. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM *et al.* Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000; 95: 3702-9.
96. Couban S, Simpson DR, Barnett MJ *et al.* A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* 2002; 100: 1525-31.
97. Eapen M, Horowitz MM, Klein JP *et al.* Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4872-80.
98. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174-8.
99. Madrigal JA, Cohen SB, Gluckman E *et al.* Does Cord blood transplantation result in lower graft-versus-host disease? It takes more than two to tango. *Hum Immunol* 1997; 56: 1-5.
100. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA *et al.* Graft-versus-host disease in children who have received a Cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000; 342: 1846-54.

101. Rocha V, Cornish J, Sievers EL *et al.* Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; 97: 2962-71.
102. Rocha V, Labopin M, Sanz G *et al.* Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2276-85.
103. Takahashi S, Iseki T, Ooi J *et al.* Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. *Blood* 2004; 104: 3813-20.
104. Pico JL, Ostronoff M, Droz JPI. High dose chemotherapy with cisplatin, etoposide and cyclophosphamide (PEC protocol) followed by autologous bone marrow support in non-seminomatous germ cell tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1989; 8:12.
105. Stadtmauer EA; O'Neill A, Goldstein LJ, Crilley P. Phase III randomized trial of high-dose chemotherapy (HDC) and stem cell support (SCT) shows no difference in overall survival or severe toxicity compared to maintenance chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluoracil (CMF) for women with metastatic breast cancer who are responding to conventional induction chemotherapy: The Philadelphia Intergroup Study (PBT-1). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18:1a
106. Shinozuka T; Murakami M, Miyamoto T. High dose chemotherapy (HDC) with autologous bone marrow transplantation (ABMT) in ovarian cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1991; 10: 193.
107. Stiff PJ; Bayer R; Kerger C; Potkul RK; Malhotra D; Peace DJ *et al.* High-dose chemotherapy with autologous transplantation for persistent relapsed ovarian cancer: a multivariate analysis of survival for 100 consecutively treated patients. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1309-17.
108. Schmitz N; Dreger P; Zander A; Ehninger G; Wandt H; Fauser AA *et al.* Results of a randomized controlled, multicentre study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) in patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma undergoing autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 1995; 15: 261-66.
109. Gorin NC; Labopin M; Laporte JP; Douay L; Lopez M; Lesage S *et al.* Importance of marrow dose on posttransplant outcome in acute leukemia: models derived from patients autografted with mafosfamide-purged marrow at a single institution. *Exp Hematol* 1999; 27: 1822-30.
110. Laporte GF, Larson RA. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Oncol* 1997; 24: 70-8.

111. Attal M; Harousseau JL; Stoppa AM; Sotto JJ; Fuzibet JG; Rossi JF *et al.* A prospective randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 1996; 335: 91-7.
112. Gianni AM; Bregni M, Siena S; Brambilla C; Di Nicola M; Lombardi F *et al.* Highdose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation compared with MACOP-B in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1997; 336: 1290-97.
113. De Santis GC, Prata KL. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2009; 42(1): 36-47.
114. Lopez- Bejar M, Lopez-Gatius F, Camon J, Rutllant J, Labernia J. Development in vitro of rabbit embryos after freezing by two-step or ultrarapid cooling methods. *J Vet Med* 1994; 41: 780-90.
115. Douay L, Gorin NC, David R, Stachowiak J, Salmon C, Najman A *et al.* Study of granulocyte-macrophage progenitor (CFUc) preservation after slow freezing of bone marrow in the gas phase of liquid nitrogen. *Exp. hematol.* 1982; 10: 360-6.
116. De Santis GC, Orellana MD, Palma PVB, Silva ARL, Lemos MM, Covas DT, *et al.* Avaliação de toxicidade do dimetilsulfóxido sobre as células precursoras hematopoéticas (CD34+). *Ser Monogr Esc Bras Hematol* 2001; 8: 151.
117. De Santis GC. Transfusão de granulócitos. *Medicina (Ribeirão Preto)* 1999; 32: 470-7.
118. Allen ED, Weatherbee L, Permod PA. Post-thaw suspension of red cells cryopreserved with hydroxyethyl starch. *Cryobiology.* 1978; 15: 375-81.
119. Röllig C, Babatz J, Wagner I, Maiwald A, Schwarze V, Ehninger G *et al.* Thawing of cryopreserved mobilized peripheral blood-comparison between waterbath and dry warming device. *Cytotherapy* 2002; 4: 551-5.
120. Milone G, Mercurio S, Strano A, Leotta S, Pinto V, Battiato K *et al.* Adverse events after infusions of cryopreserved hematopoietic stem cells depend on non-mononuclear cells in the infused suspension and patient age. *Cytotherapy.* 2007; 9:348-55.
121. Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, Colombo A, Bonfichi M, Malcovati L *et al.* Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone marrow transplant.* 1999; 23: 533-7.
122. Keung YK, Lau S, Elkayam U, Chen SC, Douer D. Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone marrow transplant.* 1994; 14:363-7.

123. Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, Le Forestier C, Divine M, Duedari N. A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone marrow transplant.* 1991; 8:291-4.
124. Calmels B, Houzé P, Hengesse JC, Ducrot T, Malenfant C, Chabannon C. Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing. *Bone marrow transplant.* 2003; 31:823-8.
125. Rodríguez L, Velasco B, García J, Martín-Henao GA. Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethyl sulfoxide from hematopoietic grafts after thawing. *Transfusion* 2005; 45:1391-7.
126. Naoum FA, Martins LTV, Castro NS, Barros JC, Chiattonne CS. Perfil microbiológico dos pacientes nos primeiros trinta dias após transplante de medula óssea do Serviço de Transplantes da Santa Casa de São Paulo. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24(2): 91-96.
127. Klatersky J. Science and pragmatism in the treatment and prevention of neutropenic infection. *J. Antimicrob Chemother* 1998; 41(D): 13-24.
128. Nucci M, Maiolino A. Infecções em transplante de medula óssea. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2000; 33: 278-93.
129. Donnelly JP. Bacterial complications of transplantation: diagnosis and treatment. *J Antimicrob Chemother* 1995;36 (B) :59-72.
130. Steiner M; Villablanca J; Kersey J; Ramsay N; Haake R; Ferrieri P *et al.* Viridans streptococcal shock in bone marrow transplantation patients. *Am J Hematol* 1993; 42:354-358.
131. Engels EA, Lau J, Barza M. Efficacy of quinolone prophylaxis in neutropenic cancer patients: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 1998; 16:1179-1187.
132. Carratala J, Fernandez-Sevilla A, Tubau F *et al.* Emergence of quinolone-resistant *Escherichia coli* bacteremia in neutropenic patients with cancer who have received prophylactic norfloxacin. *Clin Infect Dis* 1995; 20:557-560.
133. Nucci M, Pulcheri W, Spector N *et al.* Quinolone prophylaxis in neutropenic patients: Efficacy versus resistance. *Oncol Reports* 1994; 1:1101-1105.

134. Yeh SP, Hsueh EJ, Yu MS *et al.* Oral ciprofloxacin as antibacterial prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation: a reappraisal. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:1207-1211.
135. Frere P, Hermanne JP, Debouge MH *et al.* Changing pattern of bacterial susceptibility to antibiotics in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:589-594.
136. Collin BA, Leather HL, Wingard JR *et al.* Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin Infect Dis* 2001; 33:947-953.
137. Sepkowitz KA. Antibiotic prophylaxis in patients receiving hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:367-371.
138. Nucci M. Resistant bacteria in stem cell transplant recipients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24 (3): 220-7.
139. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients: recommendations of the CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow transplantation. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49:1-125.
140. Avril M, Hartmann O, Valteau-Couanet D *et al.* Antiinfective prophylaxis with ceftazidime and teicoplanin in children undergoing high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11:63-73.
141. Ariffin H, Navaratnam P, Mohamed M *et al.* Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in children with febrile neutropenia. *Int J Infect Dis* 2000; 4:21-25.
142. Ford CD, Reilly W, Wood J *et al.* Oral antimicrobial prophylaxis in bone marrow transplant recipients: randomized trial of ciprofloxacin versus ciprofloxacin-vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1402-1405.
143. Attal M, Schlaifer D, Rubie H *et al.* Prevention of gram-positive infections after bone marrow transplantation by systemic vancomycin: a prospective, randomized trial. *J Clin Oncol* 1991; 9:865-870.
144. EORTC. Reduction of fever and streptococcal bacteremia in granulocytopenic patients with cancer. A trial of oral penicillin V or placebo combined with pefloxacin. International Antimicrobial Therapy Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *JAMA* 1994; 272:1183-1189.

145. Cruciani M, Rampazzo R, Malena M *et al.* Prophylaxis with fluoroquinolones for bacterial infections in neutropenic patients: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 1996; 23:795-805.
146. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP *et al.* 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002; 34:730-751.
147. Del Favero A, Menichetti F, Martino P *et al.* A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial comparing piperacillin-tazobactam with and without amikacin as empiric therapy for febrile neutropenia. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1295-1301.
148. Micozzi A, Venditti M, Monaco M *et al.* Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 2000; 31:705-711.
149. Krcmery V, Jr., Sykora P, Trupl J *et al.* Antibiotic use and development of resistance in blood culture isolates: 8 years of experience from a cancer referral center. *J Chemother* 2001; 13:133-142.
150. Amari EBE, Chamot E, Auckenthaler R *et al.* Influence of previous exposure to antibiotic therapy on the susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1859-1864.
151. Nouér SA, Pinto M, Piffano F *et al.* Risk factors for nosocomial carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [abstract]. 12nd Annual Meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America 2002; Salt Lake City, UT, April 6-9, 2002.
152. Richet HM, Andremont A, Tancrede C *et al.* Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocytic leukemia. *Rev Infect Dis* 1991; 13:211-215.
153. Knowles S, Herra C, Devitt E *et al.* An outbreak of multiply resistant *Serratia marcescens*: the importance of persistent carriage. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:873-877.
154. Veach LA, Pfaller MA, Barrett M *et al.* Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2064-2068.
155. Wenzel RP, Edmond MB. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. *Clin Infect Dis* 1998; 27:245-249.
156. Tornieporth NG, Roberts RB, John J *et al.* Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis* 1996; 23:767-772.



157. Koc Y, Snyderman DR, Schenkein DS *et al.* Vancomycin-resistant enterococcal infections in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:207-209.
158. Hirji Z, Saragosa R, Dedier H, Crump M, Franke N, Burrows L *et al.* Contamination of bone marrow products with an actinomycete resembling microbacterium species and reinfusion into autologous stem cell and bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2003; 36:115-121.
159. Larrea L, Rubia J, Soler MA, Ribas P, Fernández JA, Picón I *et al.* Quality control of bacterial contamination in autologous peripheral blood stem cells for transplantation. *Haematologica* 2004; 89: 1232-1237.
160. Kamble R, Pant S, Selby GB, Dabaja MAK, Sethi S, Kratochvil K *et al.* Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell grafts-incidence, clinical outcome, and cost-effectiveness: an analysis of 735 grafts. *Transfusion*. 2005; 45: 874-878.
161. Lowder JN, Whelton P. Microbial contamination of cellular products for hematolymphoid transplantation therapy: assessment of the problem and strategies to minimize the clinical impact. *Cytother*. 2003; 5: 377–390.
162. Webb IJ, Coral PS, Andersen JW. Sources and sequelae of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. *Transfusion*. 1996; 36: 782–788.
163. Prince HM, Page SR, Keating A, Saragosa RF, Vukovic NM, Imrie KR *et al.* Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood. *B.M. Transplant* 1995; 15: 87–91.
164. Klein MA, Kadidlo D, McCullough J, McKenna DH, Burns LF. Microbial Contamination of Hematopoietic Stem Cell Products: Incidence and clinical Sequelae. *Biol. of Blood and Marrow Transp.* 2006; 12: 1142-49
165. Mele L, Dallavalle FM, Verri G, Balza G, Allione B, Salvi F *et al.* Safet control of peripheral blood progenitor cell processing- Eight year-survey of microbiological contamination and bag ruptures in a single institution. *Transf. and Apher. Scie.* 2005; 33: 269-274
166. Jestice HK, Farrington M, Hunt C, Matthews I, Scott MA, Foreman J *et al.* Bacterial contamination of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus Med* 1996; 6: 103–110.
167. Padley D, Koontz F, Trigg ME, Gingrich R, Strauss RG. Bacterial contamination rates following processing of bone marrow and peripheral blood progenitor cell preparations. *Transfusion*. 1996; 36: 53-56.

168. Espinosa MTF, Fox R, Creger RJ, Lazarus HM. Microbiologic contamination of peripheral blood progenitor cells collected for hematopoietic cell transplantation. *Transfusion*. 1996; 36: 789-793.
169. Attarian H, Bensinger WI, Buckner CD, McDonald DL, Rowley SD. Microbial contamination of peripheral blood stem cell collections. *B. M. Transplant*. 1996; 17: 699-702.
170. Smith D, Bradley SJ, Scott GM. Bacterial contamination of autologous bone marrow during processing. *J Hosp Infect*. 1996; 33: 71-76.
171. Farrington M, Matthews I, Jestice HK *et al*. Bacterial contamination of autologous bone marrow during processing. *J Hosp Infect*. 1996; 34: 230-233.
172. Fountain D, Ralston M, Higgins N *et al*. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*. 1997; 37: 585-591.
173. Schwella N, Rick O, Heuft HG, Miksits K, Zimmermann R, Zingsen J. *et al*. Bacterial contamination of autologous bone marrow: reinfusion of culture-positive grafts does not result in clinical sequelae during the posttransplantation course. *Vox Sang*. 1998; 74: 88-94.
174. Patah PA, Parmar S, McMannis J, Sadeghi T, Karandish S, Rondon G *et al*. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products: clinical outcome. *B M Transp*. 2007; 40: 365-368.
175. Ritter M, Schwedler J, Beyer J, Movassaghi K, Mutters R, Neubauer A *et al*. Bacterial contamination of ex vivo processed PBPC products under clean room conditions. *Transfusion*. 2003; 43: 1587-1595.
176. Padley DJ, Greiner CW, Heddlesten-Rediske TL, Hopkins MK, Maas ML, Gastineau DA. Endogenous microbial contamination of cultured autologous preparations in trials of cancer immunotherapy. *Cytother*. 2003; 5:147-152.
177. Cassens U, Ahlke C, Garritsen H, Krakowitzky P, Wüllenweber J, Fischer RJ *et al*. Processing of peripheral blood progenitor cell components in improved clean areas does not reduce the rate of microbial contamination. *Transfusion*. 2002; 42: 10-17.
178. Kipp F, Linnemann E, Fischer RJ, Sibrowski W, Cassens U. Cryopreservation reduces the concentration of detectable bacteria in contaminated peripheral blood progenitor cell products. *Transfusion* 2004; 44: 1098-1103.
179. Aksu G, Ruhi MZ, Akan H, Bengisun S, Üstün C, Arslan Ö *et al*. Aerobic bacterial and fungal infections in peripheral blood stem cell transplants. *B M Transp*. 2001; 27:201-205.

## 5. ARTIGO EM INGLÊS

### AUTOLOGOUS TRANSPLANT : MICROBIAL CONTAMINATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELL PRODUCTS IN A TERTIARY CARE HOSPITAL

Running title: MICROBIAL CONTAMINATION OF STEM CELL PRODUCTS

Igor Dullius Almeida<sup>1</sup>, Tissiana Schmalfuss<sup>2</sup>, Liane Marise Röhsig<sup>2</sup>, Luciano Zubaran  
Goldani<sup>3</sup>

**Keywords:** autologous transplant, hematopoietic stem cell products, microbial contamination, quality control; bacterial contamination.

<sup>1</sup> Hemotherapy Section - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Cryobiology Unit of Blood Umbilical Cord and Placental Bank of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Infectious Diseases Section - Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil

**CORRESPONDING AUTHOR:** Igor Dullius Almeida, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hemotherapy Section. Rua Ramiro Barcelos 2350 – Porto Alegre – RS, Brasil, 90035-003. Phone number: (55.51) 34433393 E-mail: igordullius@yahoo.com.br

## Abstract

**Objectives.** The hematopoietic progenitor cells from peripheral blood (HPCPB) are commonly used for autologous and allogenic transplants in patients with the most various onco-hematological diseases despite the utilization of sterile techniques during collection and the processing of these products, bacterial contamination can occur. Our objective was to investigate the microbial contamination in hematopoietic progenitor cells from peripheral blood (HPCPB) products. **Material/Subjects and Methods.** Microbial cultures of 837 HPCPB products between 2000 and 2009 were retrospectively analysed to determine the incidence of culture positivity and identify the main organisms causing contamination. The microbiological studies were performed with an automatized system (BacT/Alert ® bioMérieux Corporate). **Results.** Thirty-six (4.3%) of 837 microbial cultures were contaminated. Coagulase-negative *Staphylococcus* was the most frequent bacteria isolated in HPCPB products (20 (56%) of the 36 positive microbial cultures). Considering the thirty-six contaminated samples, 22 HPCPB products were infused and 14 discarded. Pre and post infusion antibiotic therapy of the contaminated products was established based on the isolated microorganism and its antibiogram. **Conclusion.** This study is in accordance with other published surveys, showing that the microbial contamination of HPCPB products is low, and contamination of those products, in most cases, does not compromise the success of the transplant.

## Introduction

The hematopoietic progenitor cells from peripheral blood of (HPCPB) are commonly used for autologous and allogenic transplants in patients with the most various onco-hematological diseases. The progenitor hematopoietic cells are capable of self-renewal and differentiation in all blood cells lineage. Bone marrow is the traditional source for obtaining HPCPB, it is collected by multiple punctures and aspirations of the posterior iliac crests. The aspirated material contains red blood cells, leukocytes, platelets, mast cells and plasma and pluripotent hematopoietic progenitor cells. In recent years, the collection of HPCPB via apheresis, has been increasingly used. The combination of high doses of chemotherapy with posterior transplantation of these cells constitutes the standard treatment for many onco-hematological diseases.

Obtainment, processing, storing and transplantation of HPCPB involve many steps which are normally performed in different environments and might result in microbial contamination. In fact, HPCPB manipulation during processing and pre-and post-cryopreservation are important sources of bacterial contamination in these cells. [1] Microbial contamination of HPCPB also might result from the donor. Donors with asymptomatic bacteremia, or who are recovering from a bacterial infection might develop episodes of transient bacteremia which can lead to product contamination. In addition, HPCPB are collected by apheresis, which often requires the insertion of central venous catheters (CVC). Infections associated with CVCs are an important source of transitory bacteremia in patients and a possible cause of HPCPB contamination. [2]

Thus, in order to ensure a final product appropriate for transplant, it is essential to follow a policy of quality control. Such controls should include CD34 + cell count, cell viability assessment, and microbiological monitoring. [3]

The main objective of this study herein was to investigate the incidence of positive microbial cultures for HPCPB products from donors attending a tertiary care hospital in the period from 2000 to 2009. In parallel, we also described the major bacteria contaminating the HPCPB products, the pre- and post-infusion antibiotic therapy for the contaminated cells, In addition, we analyzed the blood cultures results post-defrosting the bag containing HPCPB, which were infused or discarded according to medical decision.

## **Material and Methods**

Microbial cultures of 837 HPCPB products of donors attending a tertiary care hospital located in southern Brazil from 2000 to 2009 were retrospectively analyzed to determine the incidence of microbial culture positivity and identification of the main organisms causing contamination. In addition, the charts of the donors with positive HPCPB microbial cultures were reviewed.

For the sterility control of the HPCPB products, after the cryopreservation process and before freezing, 3 ml-samples of the product were inoculated in pediatric blood cultures bottles with 20ml of activated charcoal ((BacT/Alert ® bioMérieux Corporate). In addition, after the blood bag defrosting, samples are collected for microbial cultures at the moment of the infusion. Such action

serves to verify a possible contamination at the time of water-bath defrosting. Cultures were sent to the microbiology department, where they were incubated for five days. When positive, microscopy and bacterial isolation were performed and identified through standard biochemical tests.

Data were organized and analyzed by the Microsoft Excel 2007 ® program according to the distribution of frequency.

Microbiological surveys were performed with automated BacT/Alert ® (bioMérieux Corporate) at 36°C. The products were changed into a Class I laminar-flow cabinet with HEPA filters (Veco do Brasil Ind. Com. Equipamentos LTDA).

The study was approved by the local ethics committee which is credentialed by the National Committee of Ethics in Research of the National Health Department and the Office for Human Research Protection (OHRP) of the United States.

## **Results**

A total of 837 HPCPB collections and microbial cultures were performed at the hemotherapy section from 2000 to 2009. The average volume drawn and time for collection and processing were 255 ml and 206 minutes respectively. The underlying diseases and the main characteristics of the patients that received HPCPB products are presented in Table 1. The main underlying diseases included multiple myeloma (n=314), followed by Hodgkin lymphoma

(n=143), non-Hodgkin lymphoma (n=132), acute myeloid leukemia (n=63), neuroblastoma (n=52), Wilms tumor (n=28), medulloblastoma (n=23), and Ewing sarcoma (n=16).

Thirty-six of 837 collected samples (4.3%) presented positive cultures for bacteria. In figure 1, it is presented the annual contamination rate of the HPCPB products from 2000 to 2009. As shown in Figure 2, most of the bacteria identified are part of the normal skin microbiota. The most frequently isolated organism was coagulase-negative *Staphylococcus* (56%), followed by *Staphylococcus aureus* (17%), *Bacillus* sp (8%), coryneiform gram-positive bacilli (8%), non-coryneiform gram-positive bacilli (6%), *Enterobacter* sp. (3%), and *Citrobacter freundii* (3%).

Twenty-two of 36 HPCPB products with positive microbial cultures were infused and 14 were discarded based on the medical staff's option. Considering that HPCPB products contamination has an impact in reducing the number of CD34 + cells reducing hematopoietic engraftment after peripheral blood stem cell transplantation, Table 2 presents the CD34+ counts of the discarded contaminated HPCPB collections and the remaining stock collections for each patient.

As shown in Table 3, pre-infusion and post-infusion antibiotic therapy of the contaminated products was based on the isolated microorganism and its antibiogram. Although 9 of 22 infusions had not received antimicrobial therapy prior to the infusion of HPCPB products, all of the patients received during or after the HPCPB infusion.



Twelve (55%) of 22 contaminated HPCPB collections presented positive microbial cultures after freezing-thawing process, whereas the remaining ones (45%), the cultures were negative.

## Discussion

Similar to our results, previous studies had reported microbial contamination rates, varying from 1.6% a 4.5%. [4-14] The incidence of microbial contamination of HPCPB products in those studies varied according to the source of those cells. Kamble *et al* [7] have shown contamination in 4 of the 26 collections (15%) from cord blood, 8 of 177 (4.5%) from bone marrow, and 21 of 532 (3.9%) from peripheral blood.

Coagulase-negative *Staphylococcus* was the organism predominantly isolated in this study, with 20 (56%) of the 36 positive microbial cultures. Most of the previous studies also identified the Coagulase-negative *Staphylococcus* and other bacteria that often colonize the skin and are water contaminants [1-25]. The potential contamination sources of HPCPB products include reagents, venous access-catheters, aseptic failure, cell processing, bags disruption, equipment used as water-bath, incubators and centrifuges. [1-25]

Even though contaminated HPCPB products are often discarded, twenty two of the 36 contaminated collections were infused. Authors have reported the success achieved after the infusion of the contaminated HPCPB products, with few clinical consequences. [7,18,26] In fact, contaminated HPCB products should not be automatically discarded, because, when administered with

specific precautions, they do not have either adverse effects or significant sequelae. As shown in Table 4, specific measurements should be considered at when deciding to discard or administer the product [27].

CD34<sup>+</sup> cell dose correlated with both early engraftment kinetics and late peripheral blood counts. A threshold effect between rapid and slow engraftment occurred at  $5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells/kg. In addition, hemoglobin and platelets were significantly higher at 180, 360, and 540 days after transplantation for those patients who received  $>5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells/kg. Therefore, for autologous transplantations, a higher CD34<sup>+</sup> cell dose appears to correlate with improved long-term hematopoiesis. In our study, most of the contaminated collections presented low CD34<sup>+</sup> cell dose. Despite contamination, some frozen stocks of those collections presented high CD34<sup>+</sup> cell dose, which could be used in further HCPBC transplants. [28]

Contamination of HPCPB products with clinically significant adverse outcome occurs especially with potentially pathogenic bacteria but is rare, with an incidence of 0.3% from notified cases. [7] Klein *et al* [16] have reported a patient that died due to multi-organ-system failure, after having received HPCPB product contaminated with *Burkholderia cepacia*, even beginning with the infusion of proper antimicrobials. Moreover, contaminated HPCPB products with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has been shown to severe disseminated infection in patients [7.] Interestingly, bacterial contamination of those products does not affect the patients transplant kinetics. It was previous demonstrated by Schwella *et al* that there was no significant differences in hematopoietic recovery time, duration of fever and the number of days of antimicrobials administration in patients who had received contaminated

HPCPB products when compared with those who had received products free of contamination [25].

In fact, previous studies have shown that most of the patients receive successfully an HPCPB product with prophylactic antibiotic therapy before the infusion of contaminated product based on the isolated organism, sensitivity to antimicrobial agents and urgency for the transplant. [6,16] This decision differs in different centers. For instance, Kamble *et al* [7] have reported that prophylaxis is unnecessary, once most of the contaminations are caused by non-pathogenic bacteria and their infusions rarely cause bacteremia or septicemia.

In our study approximately 50% of the HPCPB collections were found to be still contaminated after the freeze-thawing process. One of the reasons for this finding could be the contamination of HPCPB products with a low number of colony forming unit of bacteria. In addition, cryoprotectors used in HPCPB products, such as the organosulfur compound dimethyl sulfoxide (DMSO), has potent bactericidal properties against gram-positive and gram-negative bacteria. [11,27,29]. Kipp *et al* [4] have shown that CFUs of different bacteria diminished after the cryopreservation process. For instance, CFU of *Staphylococcus epidermidis*, decreased approximately 13.7% after addition of DMSO. Moreover, the presence of active phagocytic cells in the frozen products could additionally eliminate existing bacteria. [4] On the other hand, gram-positive bacteria such as *Staphylococcus sp* are known to survive after the cryopreservation process [7]. Different studies have shown conflicting results regarding the survival of coagulase-negative *Staphylococcus* after the cryopreservation process [6,13,18,25].

Evidences have shown that there is impact of the aseptic conditions on bacterial contamination in areas where HPCPB products are handled and processed. There is a 5.2% decrease in contamination HPCPB products at a clean bench compared with 0.8% decrease at a bench in laboratory implementing good manufacturing practices with certified conditions [9]. Thus, the quality control and the good practices of handling and conservation of reagents and equipment used in cell cryopreservation are essential to provide for patients safer products with reduction of the probable contamination sources [17]

In summary, we have shown that the contamination of HPCPB products is overall low and it is usually caused by the normal skin microbiota, which could survive to cryopreservation process. Contamination of these products does not compromise, in most cases, the success of the transplant. The incidence of contamination of HPCPB products and procedures performed for HPCPB process at our hospital are in accordance with the parameters used in centers internationally recognized and certified.

## References

1. Hirji Z, Saragosa R, Dedier H, Crump M, Franke N, Burrows L, Jamieson F, Brown S, Gardam MA. Contamination of bone marrow products with an actinomycete resembling *Microbacterium* species and reinfusion into autologous stem cell and bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2003; 36:115-121.
2. Naoum FA, Martins LTV, Castro NS, Barros JC, Chiattonne CS. Perfil microbiológico dos pacientes nos primeiros trinta dias após transplante de medula óssea do Serviço de Transplantes da Santa Casa de São Paulo. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24: 91-96.
3. Larrea L, de la Rubia J, Soler MA, Ribas P, Fernández JA, Picón I, García-Boyero R, García-Bellés C, Roig R. Quality control of bacterial contamination in autologous peripheral blood stem cells for transplantation. *Haematologica* 2004; 89: 1232-1237.
4. Kipp F, Linnemann E, Fischer RJ, Sibrowski W, Cassens U. Cryopreservation reduces the concentration of detectable bacteria in contaminated peripheral blood progenitor cell products. *Transfusion* 2004; 44: 1098-1103.
5. Aksu G, Ruhi MZ, Akan H, Bengisun S, Üstün C, Arslan Ö, Ozenci H. Aerobic bacterial and fungal infections in peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transp.* 2001; 27:201-205.

6. Patah PA, Parmar S, McMannis J, Sadeghi T, Karandish S, Rondon G, Tarrand J, Champlin R, de Lima M, Shpall EJ. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products: clinical outcome. *Bone Marrow Transp.* 2007; 40: 365-368.
7. Kamble R, Pant S, Selby GB, Dabaja MAK, Sethi S, Kratochvil K, Kohrt N, Ozer H. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell grafts- incidence, clinical outcome, and cost-effectiveness: an analysis of 735 grafts. *Transfusion.* 2005; 45: 874-878.
8. Lowder JN, Whelton P. Microbial contamination of cellular products for hematolymphoid transplantation therapy: assessment of the problem and strategies to minimize the clinical impact. *Cytother.* 2003; 5: 377–390.
9. Ritter M, Schwedler J, Beyer J, Movassaghi K, Mutters R, Neubauer A, Schwella N. Bacterial contamination of ex vivo processed PBPC products under clean room conditions. *Transfusion.* 2003; 43: 1587–1595.
10. Padley DJ, Greiner CW, Heddlesten-Rediske TL, Hopkins MK, Maas ML, Gastineau DA. Endogenous microbial contamination of cultured autologous preparations in trials of cancer immunotherapy. *Cytother.* 2003; 5:147–152.
11. Cassens U, Ahlke C, Garritsen H, Krakowitzky P, Wüllenweber J, Fischer RJ, Peters G, Sibrowski W. Processing of peripheral blood progenitor cell components in improved clean areas does not reduce the rate of microbial contamination. *Transfusion.* 2002; 42: 10–17.

12. Webb IJ, Coral PS, Andersen JW. Sources and sequelae of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. *Transfusion*. 1996; 36: 782–788.
13. Prince HM, Page SR, Keating A, Saragosa RF, Vukovic NM, Imrie KR, Crump M, Stewart AK. Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 87–91.
14. Almeida ID, Coitinho AS, Juckowsky CA, Schmalfuss T, Balsan AM, Röhsig LM. Controle de esterilidade de produtos de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010;32(1):23-28.
15. Nifong TP, Ehmann C, Mierski JA, Domen RE, Rybka WB. Favorable outcome after infusion of Coagulase-negative Staphylococci-contaminated peripheral blood hematopoietic cells for autologous transplantation. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127: e19- e21.
16. Klein MA, Kadidlo D, McCullough J, McKenna DH, Burns LF. Microbial Contamination of Hematopoietic Stem Cell Products: Incidence and clinical Sequelae. *Biol. of Blood and Marrow Transp.* 2006; 12: 1142-49
17. Mele L, Dallavalle FM, Verri G, Balza G, Alliome B, Salvi F, Levis A, Caraccio V, Borzini P. Safety control of peripheral blood progenitor cell processing- Eight year-survey of microbiological contamination and bag ruptures in a single institution. *Transfus Apher. Scie.* 2005; 33: 269-274

18. Jestice HK, Farrington M, Hunt C, Matthews I, Scott MA, Foreman J, Marcus RE. Bacterial contamination of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus Med* 1996; 6: 103–110.
19. Padley D, Koontz F, Trigg ME, Gingrich R, Strauss RG. Bacterial contamination rates following processing of bone marrow and peripheral blood progenitor cell preparations. *Transfusion*.1996; 36: 53-56.
20. Espinosa MTF, Fox R, Creger RJ, Lazarus HM. Microbiologic contamination of peripheral blood progenitor cells collected for hematopoietic cell transplantation. *Transfusion*. 1996; 36: 789-793.
21. Attarian H, Bensinger WI, Buckner CD, McDonald DL, Rowley SD. Microbial contamination of peripheral blood stem cell collections. *B. M. Transplant*. 1996; 17: 699-702.
22. Smith D, Bradley SJ, Scott GM. Bacterial contamination of autologous bone marrow during processing. *J Hosp Infect*. 1996; 33: 71-76.
23. Farrington M, Matthews I, Jestice HK, Scott MA, Marcus RE, Hunt C, Foreman J. Bacterial contamination of autologous bone marrow during processing. *J Hosp Infect*. 1996; 34: 230-233.
24. Fountain D, Ralston M, Higgins N, Gorlin JB, Uhl L, Wheeler C, Antin JH, Churchill WH, Benjamin RJ. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*. 1997; 37: 585-591.



25. Schwella N, Rick O, Heuft HG, Miksits K, Zimmermann R, Zingsen J, Eckstein R, Huhn D. Bacterial contamination of autologous bone marrow: reinfusion of culture-positive grafts does not result in clinical sequelae during the posttransplantation course. *Vox Sang.* 1998; 74: 88-94.
26. Nasser RM, Hajjar I, Sandhaus LM, Hall GS, Avery RK, Bolwell BJ, Longworth DL, Adal K. Routine cultures of bone marrow and peripheral stem cell harvests: clinical impact, cost analysis, and review. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 886–888.
27. Padley DJ, Dietz AB, Gastineau DA. Sterility testing of hematopoietic progenitor cell products: a single-institution series of culture-positive rates and successful infusion of culture-positive products. *Transfusion.* 2007; 47:636-643.
28. Marques Júnior JFC. Conduas frente à contaminação bacteriana em concentrados de células progenitoras hematopoéticas periféricas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010; 32(1): 5-6.
29. Massumoto CM; Mizukami S; Campos MF; Silva LAG ; Mendrone Junior A; Sakashita A, Zambon E, Ostronoff M, Macedo MC, Medeiros R, Dorlhiac P, Chamone D, Dulley F. Criopreservação de medula óssea utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. *Rev Assoc Med Bras* 1997; 43:93-98.

**Table 1**

Profile of HPCPB collections performed at the Hemotherapy Department from 2000-2009

Patology	n (collections)	Age (average)	Gender	
			M	F
Amiloydosis	3	58	1	2
Erythroid series aplasiae	1	6	-	1
Pleuropulmonary blastoma	3	4	-	3
CNS Germinoma	1	13	1	-
Immunocytopoma	1	40	-	1
Acute Lymphoblastic Leukemia	2	17	-	2
Acute Lymphoide Leukemia	5	20	4	1
Acute Myeloid Leukemia	63	31	47	16
Chronic Myeloid Leukemia	2	42	-	2
T-Cell Lymphoma	1	32	-	1
Hodgkin Lymphoma	143	26	59	84
Manto Lymphoma	2	57	2	-
B-Cell Granulocytic Lymphoma	3	41	3	-
T Cell Lymphoblastic Lymphoma	1	34	1	-
Non-Hodgkin Lymphoma	132	43	82	50
Peripheral T Lymphoma	2	33	-	2
Medulloblastoma	23	12	18	5
Myelophibrosis	1	45	1	-
Multiple Myeloma	314	54	170	144
Tumor of Suprarenal Gland	3	4	3	-
Malignant neoplasm of thorax	1	7	-	1
Malignant Neoplasm of Kidney and Renal Pelvis	2	9	2	-
Neuroblastoma	52	4	41	11
Pancreatoblastoma	1	15	-	1
Pineoblastoma	2	3	-	2
Retinoblastoma	6	6	4	2
Renal Cell Sarcoma	1	4	1	-
Ewing Sarcoma	16	13	5	11
Wilms Sarcoma	1	11	1	-
Poems Syndrome +Castleman Disease	1	50	1	-
Askin Tumor	5	16	1	4
Renal Cell Tumor	1	5	1	-
Ewing Tumor	1	11	-	1
Ovarium Tumor	2	12	-	2
Endodermal Sinus Tumor	4	15	2	2
Testicle Tumor	3	28	3	-
Wilms Tumor	28	6	12	16
Germinative Tumor	4	18	4	-
<b>Total</b>	<b>837</b>		<b>470</b>	<b>367</b>

**Table 2**

CD34+ count in collection contaminated HPCPB collections \*

Bacterium	nX10 <sup>6</sup> CD34/Kg (discarded collection)	nX10 <sup>6</sup> CD34/Kg (remaining stock collections)
1- <i>Citrobacter freundii</i>	0,35	1,43
2- <i>Staphylococcus coagulase Neg.</i>	0,13	0,29
3- <i>Staphylococcus coagulase Neg.</i>		
3- <i>Staphylococcus aureus</i>		
3- <i>Staphylococcus aureus</i>	3,21	3,33
3- <i>Staphylococcus aureus</i>		
3- <i>Staphylococcus coagulase Neg.</i>		
4- <i>Staphylococcus aureus</i>	1,67	2,56
5- <i>Staphylococcus aureus</i>	0,32	1,39
6- <i>Staphylococcus coagulase Neg.</i>	3,2	7,61
7- <i>Staphylococcus aureus</i>	1,01	4,11
8- coryneform gram+ Bacilli	1,33	—
8- coryneform gram+ Bacilli		
9- <i>Staphylococcus coagulase Neg.</i>	1,27	3,14

\* Total of 14 discarded collections, some collections (n° 3 and 8) are of the same patient

**Table 3**

Antibiotic Therapy pre- and post- infusion of contaminated HPCPB \*

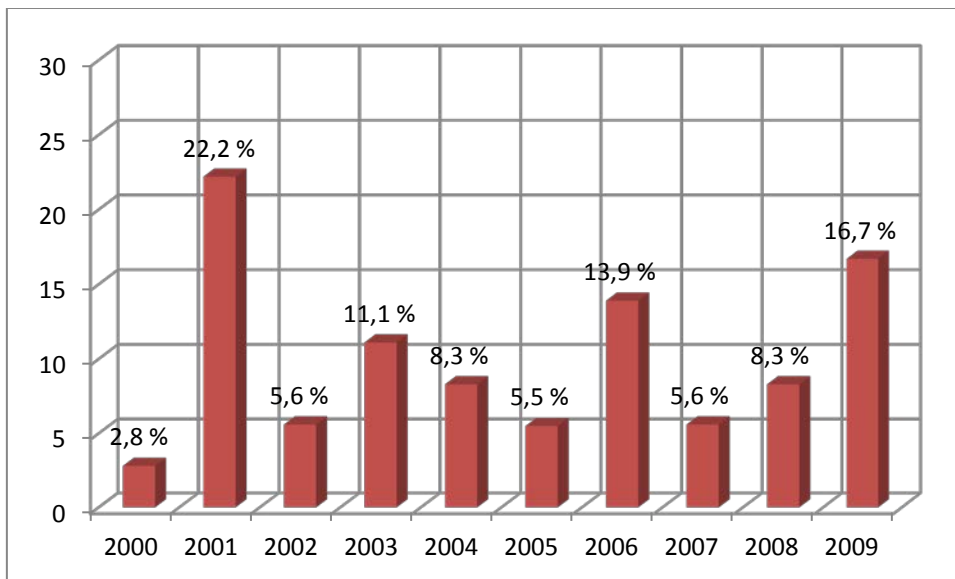
Bacterium	Pre-Infusion	Post-Infusion
1- non-coryneform gram+ Bacilli	non-administered	Norfloxacin
2- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	non-administered	Ampicillin+ Cefepime
3- <i>Bacillus</i> sp	Ciprofloxacin	Vancomycin+Ciprofloxacin
4- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Sulfa+Trimetropim	Vancomycin
5- <i>Enterobacter</i> sp.	Norfloxacin+Sulfa+trimetropim	Cefepime
6- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	non-administered	Gentamicin+Cefepime
7- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	non-administered	Vancomycin+Cefepime
8- Bacilo gram+ corineforme	Ciprofloxacin	Vancomycin+Cefepime
9- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Clindamicin	Cefepime+Amikacina
10- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Ciprofloxacin	Oxacilin+Cefepime
11- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Oxacilin	Vancomycin+Cefepime
12- <i>Bacillus</i> sp	Cefepime	Amikacina
13- <i>Bacillus</i> sp	non-administered	Vancomycin+Cefepime
14- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Clindamicin	Clindamicin
15- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	non-administered	Oxacilin+Cefepime
16- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Clindamicin	Cefepime+Oxacilin
17- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Sulfa+Trimetropin	Vancomycin
17- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Sulfa+Trimetropin	Vancomycin
18- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	non-administered	Cefepime+Clindamicin
19- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	Oxacilin	Cefepime
20- <i>Staphylococcus</i> coagulase Neg.	non-administered	Cefepime+Vancomycin
21- non-coryneform gram+ Bacilli	non-administered	Cefepime

\* The above contaminated infusions were performed in different patients, except n° 17

**Table 4**

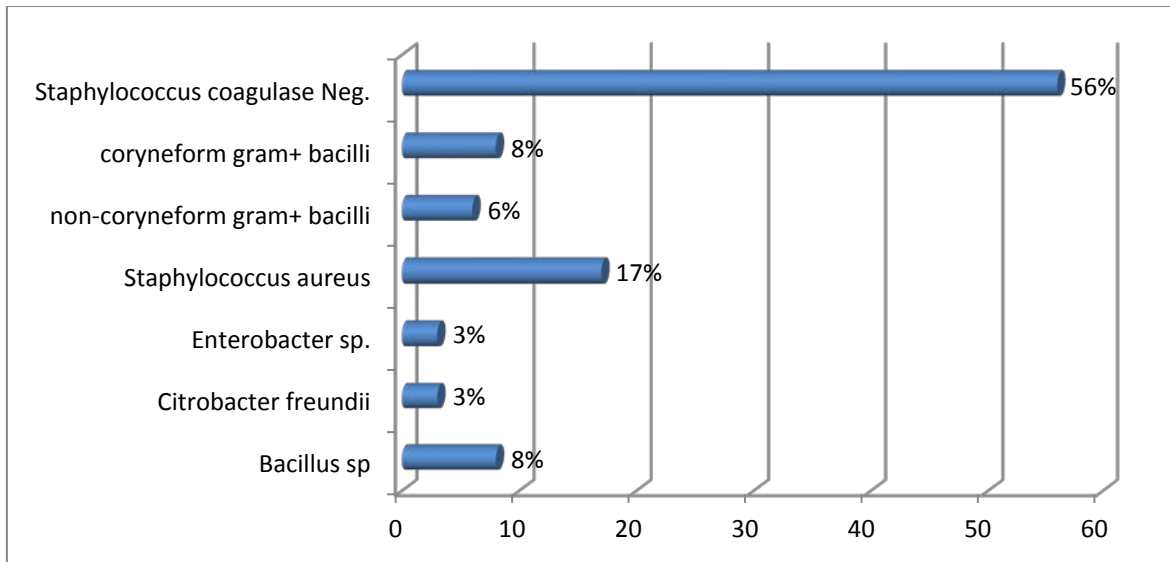
Management considerations of HPCPB products with positive microbial cultures

Administer the Product	Discard the Product
Slow growing organism	Rapidly growing organism
Skin or environmental contaminant	Enteric or pathogenic organism
Donor or patient is not available for recollection	Product can easily be replaced
New product requires remobilization or central line placement	Patient can tolerate delay and recollection
Product contains majority of total cell dose	Product contains small percentage of total cell dose



**Figure 1.** Annual rate of contamination in samples taken in the period 2000 to 2009.

Distribution of the 36 contaminated samples of total 837 made this period.



**Figure 2.** Bacteria isolated in the 36 contaminated HPCPB products.

## 6. Considerações Gerais

Os procedimentos de mobilização e de coleta por aféreses das células progenitoras hematopoéticas a partir do sangue periférico já está estabelecido como parte integrante dos transplantes de medula óssea, substituindo quase totalmente a coleta de medula óssea de crista ilíaca nos transplantes autólogos e, parcialmente, nos transplantes alogênicos, por motivos de comodidade, segurança, conforto, simplicidade, praticidade e efetividade.

A contaminação nos produtos de células progenitoras hematopoéticas pode ocorrer nas diversas etapas do processo, desde a coleta, passando pelo processamento, o qual inclui procedimentos para congelamento (criopreservação) e descongelamento, até o momento da reinfusão.

Segundo a legislação vigente no Brasil, é obrigatória a análise microbiológica para fungos e bactérias aeróbias e anaeróbias tanto para as unidades coletadas do sangue periférico quanto da medula óssea, para uso alogênico ou autólogo. Nos casos de infusão imediata, isto é, sem a necessidade de criopreservação, a bolsa pode ser liberada para infusão antes do resultado da análise microbiológica, porém, logo que disponível, o resultado deve ser registrado e comunicado ao médico responsável pela infusão.

Não há dúvida que os produtos contaminados muitas vezes devam ser reinfundidos, porém, não podemos menosprezar o fato de que as infecções são a principal causa de mortalidade e morbidade em pacientes transplantados, tanto por medula óssea, cordão umbilical como por sangue periférico, justificando que a antibioticoterapia baseada no germe isolado em cultura e antibiograma deve ser obrigatoriamente realizada para diminuir a morbimortalidade por infecção aguda nestes pacientes já imunocomprometidos tanto pela doença de base como pelo tratamento.

Esse estudo tem muita utilidade prática em sua conclusão, visto que os resultados obtidos serão muito úteis na prática clínica da equipe médica pois não existem normativas específicas que remetam o médico de como proceder em infusões de produtos de CPHSP contaminados. Nele são discutidos assuntos como controle de qualidade e acreditação, que são responsáveis em



diminuir significativamente o número de produtos contaminados. Questões como critérios para descarte ou infusão destes produtos, dependendo da situação clínica do paciente, do microorganismo isolado e das condições da coleta e mobilização entre outros.

Por fim, este trabalho de grande relevância teve o intuito de aumentar a qualidade do tratamento do paciente transplantado para se obter constante e crescente melhora dos resultados dos transplantes para pacientes de tão alta gravidade e complexidade.