

CAROLINE BONAMIN DOS SANTOS SOLA

**ANÁLISE DE FALHA DE PEGA EM 212 PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS
NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CURITIBA
2012**

CAROLINE BONAMIN DOS SANTOS SOLA

**ANÁLISE DE FALHA DE PEGA EM 212 PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS
NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós Graduação em Medicina Interna, do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr José Zanis Neto

**CURITIBA
2012**

Dedicatória

Dedico esse trabalho a meus pais por serem o exemplo perfeito de amor, dedicação e caráter.

E a meu esposo Wilson, pela compreensão e apoio emocional necessários para a realização desse trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr José Zanis Neto pela orientação e apoio na escolha do tema desta tese.

Ao Dr Marco Antônio Bitencourt pela prontidão na revisão deste estudo e disposição em me auxiliar.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini pelo incentivo constante e pelo que tem contribuído para a minha formação profissional.

À Profa Dra Vaneuza Moreira Fünke pela amizade, incentivo e confiança em meu trabalho desde a época da residência médica.

Ao Dr Samir K. Nabhan pela amizade incondicional e cumplicidade na vida pessoal e profissional.

À Dra Larissa A. Medeiros por todo carinho e amizade no decorrer desses anos de convívio.

Aos colegas de trabalho, Dra Daniela Setubal, Dra Elenaide Coutinho, Dr Michel Oliveira, Dra Gisele Loth, Dra Adriana Kolinski, Dr Lizandro Ribeiro, Dra Rebeca Toassa, Enfermeiras Terezinha Keiko e Denise Lima. A companhia de vocês tornou sempre o dia-dia mais leve e agradável.

A todos os médicos que já trabalharam do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná que atenderam os pacientes portadores de anemia de Fanconi e permitiram a coleta dos dados para essa pesquisa.

À Dra Carmem Bonfim, responsável atual pelo ambulatório de anemia de Fanconi do HC-UFPR.

À Daniela Pilloneto por me auxiliar a compreender melhor o difícil mundo da anemia de Fanconi.

A todos os envolvidos na coleta dos dados para o banco de dados do STMO, especialmente à Heliz por toda sua dedicação e auxílio na obtenção dos dados.

À querida Vandilene Friessen pela paciência e ajuda incansável na busca de dados e prontuários.

À Dra Noemi Farah, responsável pelo laboratório de Imunogenética, pela disponibilidade e orientação.

Às colegas Luciana Dornelles, Cleuza Schafhauser e Márcia Quiroga pela atenção e tempo dispensados na busca de dados nos arquivos do laboratório.

A todos os enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem que nos auxiliam no cuidado dos pacientes, por serem corresponsáveis pelo sucesso nos transplantes realizados no serviço.

A todos os funcionários da secretaria e higienização por dedicarem tanto carinho e respeito a nossos pacientes e seus familiares.

E principalmente, aos pacientes e seus familiares, por entregarem suas vidas aos nossos cuidados.

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara caracterizada por instabilidades cromossômicas que geram anormalidades somáticas de graus variáveis, falência medular progressiva e susceptibilidade aumentada a neoplasias. O único tratamento curativo é o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH), entretanto a toxicidade e falha de pega ainda são limitantes para sua realização. A falha de pega do enxerto ou rejeição é uma complicação grave e potencialmente fatal que ocorre em até 30% dos pacientes com AF submetidos ao TCTH, dependendo do tipo de doador e regime de condicionamento utilizado. Entre Janeiro de 1985 e Outubro de 2011, 238 pacientes com AF realizaram TCTH nessa instituição. Duzentos e doze pacientes foram avaliáveis quanto à pega medular e divididos em 3 grupos. O grupo 1 foi constituído por 25 pacientes que tiveram falha primária de pega (FPP). O grupo 2 por 9 pacientes com falha secundária de pega (FSP) ou evolução para leucemia e o grupo 3, com 178 casos com pega medular adequada. Os pacientes com falha primária e secundária de pega apresentaram maior duração de doença e maior número de transfusões sanguíneas prévias ao TCTH do que o grupo com pega medular ($p=0,001$ e $p<0,001$). Doador não aparentado (NAP) foi utilizado em 84% dos pacientes do G1 e apenas 33% do G3 ($p<0,001$); houve ainda menor número de transplantes totalmente compatíveis no G1 do que nos outros grupos ($p<0,001$). A fonte de células foi sangue de cordão umbilical (SCU) em 56% dos pacientes do G1 e 13% no G3. Na análise multivariada os fatores associadas a uma maior FPP foram maior número de transfusões ($p=0,003$), a utilização de doadores NAP ($p=0,001$) ou com incompatibilidades HLA ($p=0,025$) ou a ausência de fludarabina no regime de condicionamento ($p=0,005$). O fator predisponente para pega medular não sustentada ou evolução para leucemia foi maior número de transfusões ($p=0,032$). Vinte e quatro pacientes foram submetidos a um novo TCTH, sendo 20 do G1 e 4 do G2 e apenas seis pacientes estão vivos. A incidência cumulativa para a falha de pega foi de 18,9%, sendo maior nos transplantes com doadores NAP (36,2%) e com SCU (40%).

A falha de pega ou rejeição é uma complicação extremamente grave e mais frequente nos transplantes não aparentados, com incompatibilidades e em pacientes mais transfundidos. Novos regimes de condicionamento, imunomodulação ou redução do tempo para o encontro de doadores NAP podem ser alternativas na tentativa de reduzir a incidência da rejeição nos pacientes com AF.

Palavras chaves: Anemia de Fanconi, transplante de células tronco hematopoéticas, falha de pega ou rejeição

ABSTRACT

Fanconi anemia is a rare genetic disease characterized by chromosomal instabilities that causes somatic abnormalities, progressive bone marrow failure and increased susceptibility to cancer. The only curative treatment is stem cell transplantation (SCT), however the toxicity and graft failure are limitations for its realization. Graft failure or rejection is a serious and potentially fatal complication that occurs in up to 30% of patients with AF undergoing SCT depending on donor type and conditioning regimen used.

Between January 1985 and October 2011, 238 patients with FA underwent SCT. Two hundred and twelve patients were evaluable for engraftment and were divided into three groups. Group 1 consisted of 25 patients with primary graft failure. Group 2 with 9 patients with secondary graft failure or progression to leukemia and group 3 with 178 cases with adequate engraftment. Patients with primary and secondary graft failure had longer duration of the disease and higher number of blood transfusions prior to SCT than the group with adequate engraftment ($p = 0.001$ and $p < 0.001$). Unrelated donor was used in 84% of patients in G1 and 33% in G3 ($p < 0.001$); there were also less compatible transplants in G1 than in other groups ($p < 0.001$). The source of cells was umbilical cord blood in 56% of patients in G1 and 13% in G3. In multivariate analysis the factors associated with primary graft failure were a higher number of transfusions ($p = 0.003$), unrelated ($p = 0.001$) or HLA mismatches donors ($p = 0.025$) or the absence of fludarabine in the conditioning ($p = 0.005$). The predisposing factor for secondary graft failure or progression to leukemia was the higher number of transfusions ($p = 0.032$). Twenty-four patients underwent a second stem cell transplantation and only six patients are alive. The cumulative incidence of graft failure was 18,9% and higher occurrence in unrelated donors (36,2%) and with umbilical cord blood (40%).

Graft failure is a very serious complication and more frequent in unrelated transplants, donors with incompatibilities and patients higher number of transfusions. New conditionings, immunomodulation and reduction in time to find an unrelated donor may be alternatives to reduce engraftment failure in Fanconi anemia patients.

Key words: Fanconi anemia, hematopoietic stem cell transplantation, graft failure and rejection

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Principais Alterações Físicas nos Pacientes com Anemia de Fanconi.....	7
QUADRO 2- Grupos de Complementação, Gene Responsável e Ocorrência entre os Pacientes com Anemia de Fanconi.....	11

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características dos Pacientes	24
TABELA 2 - Características dos Doadores.....	25
TABELA 3- Compatibilidade HLA dos Doadores.....	26
TABELA 4 - Fonte de Células Tronco Hematopoéticas.....	26
TABELA 5- Regimes de Condicionamento.....	27
TABELA 6- Regimes de Imunoprofilaxia.....	27
TABELA 7- Fatores Associados à Falha de Pega.....	28
TABELA 8- Análise Multivariada para Falha Primária de Pega.....	32
TABELA 9- Análise Multivariada Ajustada para Falha Primária de Pega.....	32
TABELA 10- Análise Multivariada para Falha Secundária de Pega/Leucemia.....	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Vias das Proteínas na Anemia de Fanconi.....	4
FIGURA 2 – Teste de quebras cromossômicas induzidas pelo diepoxibutano.....	9

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Incidência Cumulativa de Falha de Pega.....	28
GRÁFICO 2- Incidência Cumulativa de Falha de Pega de acordo com Tipo de Doador.....	29
GRÁFICO 3- Incidência Cumulativa de Falha de Pega de acordo com a Fonte de Célula Tronco Hematopoiética.....	29
GRÁFICO 4- Sobrevida Livre de Eventos no Grupo 2.....	34
GRÁFICO 5: Sobrevida Global entre os Grupos.....	36

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

AA- anticorpos anti-HLA
AED- anticorpos anti-HLA específicos do doador
AF - anemia de Fanconi
AP- aparentado
CMV- citomegalovírus
CNT- células nucleadas totais
CSA - ciclosporina
CTH- célula tronco hematopoética
DEB - diepoxibutano
DECH- doença o enxerto contra hospedeiro
FP- falha de pega
FPP- falha primária de pega
FSP- falha secundária de pega
G-CSF- fator estimulador de colônias granulocíticas
HC-UFPR - Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HLA - antígeno leucocitário humano
HPV- papiloma vírus humano
HR- hazard ratio
IBMTR- Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea
IC- incidência cumulativa
INCOMP- incompatibilidade
LMA- leucemia mielóide aguda
MFC- malformação congênita
MO- medula óssea
MRT- mortalidade relacionada ao tratamento
NAP- não aparentado
NKC- natural killer cells
PMS- pega medular sustentada
SCU- sangue de cordão umbilical
SG- sobrevida global
TBI- irradiação corporal total
TCTH- transplante de células tronco hematopoéticas
TMO- transplante de medula óssea
TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Aspectos Gerais da Anemia de Fanconi.....	01
1.1.1 Histórico.....	01
1.1.2 Incidência.....	02
1.1.3 Patogênese.....	02
1.1.4 Quadro Clínico.....	04
1.1.5 Diagnóstico.....	08
1.1.6 Grupos de Complementação da Anemia de Fanconi.....	10
1.1.7 Mosaicismo Celular.....	11
1.2 Tratamento da Anemia de Fanconi.....	12
1.2.1 Tratamento de Suporte.....	12
1.2.2 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas.....	12
1.3 Falha de Pega.....	14
2 OBJETIVOS.....	18
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
3.1 Casuística.....	19
3.2 Metodologia.....	20
3.3 Análise Estatística.....	22
4 RESULTADOS.....	24
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÕES.....	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA ANEMIA DE FANCONI

1.1.1 Histórico

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara, descrita inicialmente por Guido Fanconi em 1927, que relatou três irmãos com anemia, anormalidades físicas e medula óssea hipocelular. O nome inicial foi de anemia perniciosiforme. Em 1929, Uehlinger propôs o nome de panmielocitopatia hipoplásica familiar quando observou também leucopenia e trombocitopenia nos indivíduos afetados¹. No ano de 1931, Naegeli sugeriu que o termo Anemia de Fanconi fosse utilizado em pancitopenias familiares com malformações congênicas associadas². Posteriormente, em 1969, Guido Fanconi propôs os critérios para o diagnóstico da AF: 1) pancitopenia; 2) hiperpigmentação cutânea; 3) malformações congênicas, especialmente no esqueleto; 4) baixa estatura desde o nascimento; 5) hipogonadismo e 6) ocorrência familiar. Ressaltou que na existência dos cinco primeiros critérios, não havia necessidade do envolvimento familiar¹.

Em 1964, Schroeder, Anschutz e Knopp descreveram a presença de quebras cromossômicas espontâneas nas culturas de linfócitos de pacientes com AF, e em 1976, estabeleceram o padrão de herança autossômico recessivo da doença³.

Auerbach, Adler e Chaganti, em 1981, descreveram o teste padrão para diagnóstico laboratorial da AF, o teste do diepoxibutano (DEB)⁴.

A primeira descrição do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) como tratamento da AF foi realizado por Gluckmann e colaboradores em 1980, com resultados modestos⁵. A partir dessa experiência inicial, diversos grupos ao redor do mundo passaram a realizar o TCTH como terapêutica nos pacientes com AF e grandes avanços foram alcançados.

1.1.2 Incidência

A incidência de indivíduos afetados é de 1 a 5 para cada milhão⁶ e a frequência de heterozigotos é de 1 em cada 300 nos Estados Unidos e Europa e 1 em 100 em judeus Ashkenazi e na África do Sul⁷. Recentemente Rosemberg relatou a chance de ocorrência de heterozigotos baseado nos registros americanos e israelenses e encontrou 1:156 a 1:209 na população americana e 1:66 a 1:128, na israelense⁸.

A distribuição entre os sexos é semelhante e ocorre em todos os grupos étnicos. A mediana de idade do diagnóstico é 6,5 anos no sexo masculino e 8 anos no feminino, entretanto pode variar desde o nascimento até os 48 anos de idade⁷.

1.1.3 Patogênese

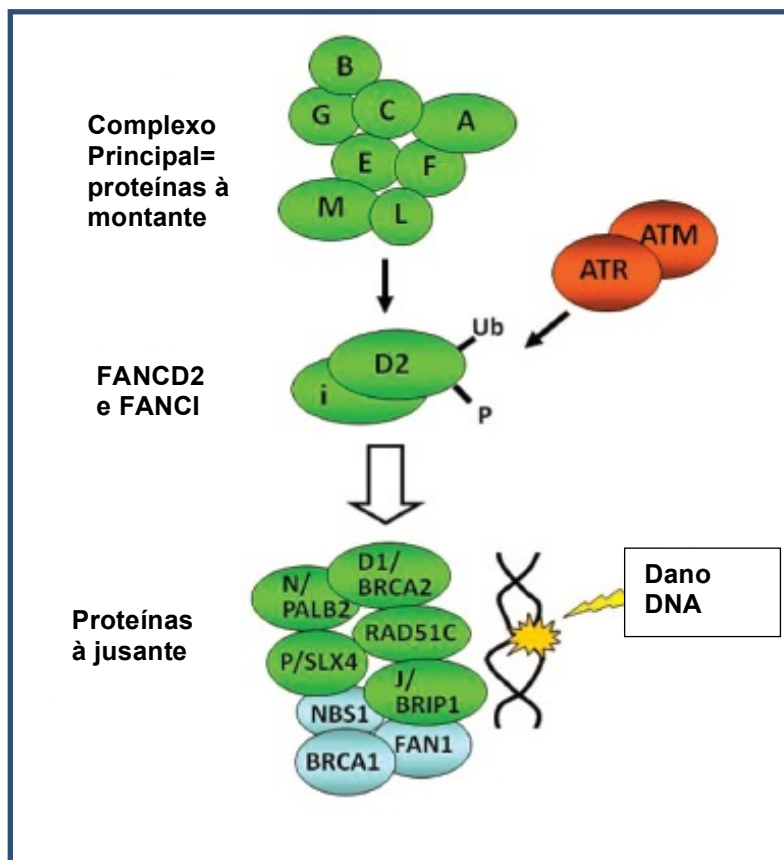
A patogênese da AF é bastante complexa e parcialmente compreendida. As células de pacientes com AF sofrem quebras cromossômicas espontaneamente ou induzidas por agentes clastogênicos (mitomicina, cisplatina, diepoxibutano). Existem muitos mecanismos propostos para a instabilidade cromossômica das células AF, entre eles estão a

hipersensibilidade ao oxigênio e seus radicais livres⁹, deficiência no reparo DNA, prolongamento da fase G2 e aumento da apoptose celular¹⁰.

Os produtos dos genes AF funcionam como reparadores do DNA, e, caso exista alguma mutação ou anormalidade em um dos genes da via, não haverá o reparo do DNA. Em resposta ao dano no DNA durante a fase S do ciclo celular, o complexo enzimático AF é ativado. Oito proteínas formam o complexo principal (complexo AF), que são FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM, também conhecidas como proteínas à montante. Mutações nos genes que codificam essas proteínas caracterizam oito grupos distintos de complementação. O complexo AF completo é essencial para a monoubiquitinação das proteínas FANCD2 e FANCI que também são proteínas AF, e que interagem com as proteínas à jusante (FANCD1/BCRA2, FANCN/PALB2, FANCJ/BRIP1, FANCP/SLX4, RAD51C e BRCA1) para o reparo do DNA^{11,12}.

As proteínas da via da AF estão representadas na figura 1.

FIGURA 1: Via das Proteínas na Anemia de Fanconi



FONTE: Adaptado de Soulier (2011)

1.1.4 Quadro Clínico

A AF caracteriza-se por anormalidades congênitas de graus variáveis, falência medular e susceptibilidade aumentada a neoplasias. As alterações hematológicas ocorrem na primeira década de vida, ao redor dos sete anos de idade e evoluem para pancitopenia com velocidade e gravidade variáveis. Até os 40 anos de idade, 90% dos pacientes com AF terão evoluído para falência medular completa⁷. A anemia e plaquetopenia geralmente precedem às alterações granulocíticas. Mesmo na fase pré anemia, já existe macrocitose, anisocitose, poiquilocitose e também é comum haver hemoglobina fetal elevada, demonstrando uma eritropoiese ineficaz, além de elevação da alfa

fetoproteína. A medula óssea encontra-se hipocelular com acúmulo de células gordurosas e as áreas de elementos hematopoiéticos vão se reduzindo na evolução da doença. As manifestações clínicas decorrentes da hematopoiese anormal são variáveis, dependendo do grau das citopenias, podendo variar de oligossintomática a elevada necessidade transfusional e neutropenia com infecções de repetição^{7,13}.

As anormalidades somáticas são muito heterogêneas e podem ocorrer em até 2/3 dos pacientes, entretanto 25 a 40% dos pacientes são fenotipicamente normais. As más formações mais frequentes são manchas hipo ou hiperocrômicas na pele, chamadas de manchas café-com-leite, presentes em aproximadamente 50% dos pacientes, baixa estatura (50%), anormalidades no rádio e/ou polegares (40%), alteração nas gônadas masculinas (30%), microcefalia com fáscies delicada (20%), anormalidades renais e oculares (20%), baixo peso ao nascimento, alteração de desenvolvimento e na audição (10%)⁷. As malformações congênitas mais frequentes estão descritas no quadro 1. Anormalidades endocrinológicas também são muito frequentes, incluindo deficiência de GH, hipotireoidismo, alteração no metabolismo de insulina e glicose, obesidade, dislipidemia e síndrome metabólica¹⁴⁻¹⁶. Devido à hipersensibilidade celular típica da doença, existe uma predisposição a neoplasias epiteliais, leucemia mielóide aguda e mielodisplasia. Pelo menos 20% dos pacientes com AF apresentarão neoplasias, sendo que o risco de tumores sólidos e neoplasias hematológicas é, respectivamente, 28 e 33% aos 40 anos⁷. As neoplasias mais comuns são a leucemia mielóide aguda e síndrome mielodisplásica que ocorrem em uma mediana de 14 anos. As alterações citogenéticas mais frequentes são

monossomia do cromossomo 7, duplicação do 1q e ganho do 3q o qual confere um prognóstico muito reservado¹⁷. As neoplasias sólidas mais frequentes são os tumores escamosos de cabeça e pescoço, colo de útero, esôfago, fígado, sistema nervoso central, pele e rins¹⁶. Pacientes que são tratados com andrógenos têm predisposição à neoplasia hepática e, existe ainda, uma elevada incidência (84%) de infecção pelo papiloma vírus humana (HPV) nos pacientes com AF¹⁸. Não há evidências claras de predisposição a neoplasias em portadores heterozigotos, a não ser quando a mutação BRCA2 está presente, que confere susceptibilidade a neoplasia de ovário e mama¹⁹.

QUADRO 1: Principais Alterações Físicas nos Pacientes com Anemia de Fanconi

Pele	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperpigmentação generalizada no tronco, pescoço ou áreas de dobras, manchas tipo “café com leite”, áreas de hipopigmentação.
Corpo	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa estatura, baixo peso, fâcies delicada
Membros Superiores	<ul style="list-style-type: none"> • Polegares: ausentes ou hipoplásicos, bífidos, rudimentares, curtos, hiperextensíveis. • Rádios: ausentes ou hipoplásticos • Mãos: clinodactilia, polidactilia, ausência do primeiro metacarpo, dedos longos ou curtos. • Unhas: displásicas
Gônadas	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo Masculino: hipodesenvolvimento, criptorquidia, hipospadia, testículos anormais / atróficos, azoospermia, fimose, alterações uretrais. • Sexo Feminino: hipodesenvolvimento, aplasia uterina/vaginal, atresia do útero, vagina ou ovário.
Outras Alterações Esqueléticas	<ul style="list-style-type: none"> • Cabeça e face: microcefalia, hidrocefalia, micrognatia, atresia de coanas. • Pescoço: doença de Sprengel, linha do cabelo com implantação baixa. • Coluna vertebral: espinha bífida, escoliose, sinus sacrococcígeo, síndrome de Klippel-Feil, vértebras extras e outras malformações vertebrais. • Membros Inferiores: luxação congênita do quadril, doença de Perthes, osteoma femoral, genuvalgo, genuvaro. • Pés: sindactilia, pé plano, polidactilia.
Olhos	<ul style="list-style-type: none"> • Estrabismo, pregas de epicanto, hipertelorismo, ptose, catarata, astigmatismo, cegueira, nistagmo, proptose, íris pequena.
Ouvidos	<ul style="list-style-type: none"> • Surdez (em geral de condução), formato anormal pavilhão auricular, atresia, displasia, infecções recorrentes, tímpano ausente, estenose do canal auditivo.
Rins	<ul style="list-style-type: none"> • Ectópicos, em ferradura, hipoplásicos ou displásicos, ausentes, hidronefrose, duplicados, com refluxo, infecções recorrentes.
Aparelho Digestivo	<ul style="list-style-type: none"> • Atresia esôfago, duodeno e jejuno, ânus imperfurado, fístula traqueoesofágica, divertículo de Meckel, hérnia umbilical, úvula hipoplásica, alterações nos ductos biliares, megacólon, diástase abdominal, síndrome de Budd-Chiari.
Aparelho Respiratório	<ul style="list-style-type: none"> • Ducto arterioso pérvio, comunicação interventricular, estenose valvar, coarctação ou hipoplasia da aorta, ausência de lobos pulmonares, tetralogia de Fallot, cardiomiopatia.
Outras Alterações	<ul style="list-style-type: none"> • Retardo no desenvolvimento, hiperreflexia, paralisia de Bell, malformações arteriais no SNC, estenose da carótida interna, hipoplasia hipofisária.

FONTE: Adaptado: Alter BP in Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. Livro Hematology of Infancy and Childhood.

1.1.5 Diagnóstico

Devido à grande diversidade fenotípica da AF, seu diagnóstico deve ser considerado em qualquer indivíduo abaixo dos 18 anos de idade com pancitopenia, mielodisplasia ou leucemia mielóide aguda com alterações físicas. Deve ser também considerado em indivíduos menores de 50 anos e carcinoma escamoso de cabeça e pescoço ou em região vulvo-vaginal²⁰. O teste utilizado para o diagnóstico da AF baseia-se na hipersensibilidade celular aos agentes citotóxicos, é o teste de quebras cromossômicas induzido pelo diepoxibutano (DEB teste). As células AF têm uma frequência aumentada de quebras cromossômicas espontâneas comparadas com as das células normais e esta frequência pode ser amplificada pela adição de agentes clastogênicos ou alquilantes ao meio de cultura. Linfócitos estimulados com fitohemaglutinina, na presença de baixas doses de DEB, são cultivados e é feita a quantificação de quebras cromossômicas, analisando-se 50 células. Os resultados são apresentados em número de alterações por células assim como a percentagem de células com alterações. De acordo com Auerback, homozigotos para AF têm uma média de 8,96 (variando de 1,3 a 23,9) quebras por célula, comparada a uma média de 0,06 (variação de 0 a 0,36) nas mesmas células de indivíduos normais^{4,21}. As alterações cromossômicas podem aparecer como rearranjos, endorreduplicações, falhas e quebras de isocromátides, poliploidia, translocações, anéis dicêntricos e figuras radiais entre cromossomos heterólogos (tri, tetra ou pentaradiais) que são um achado específico da AF. Uma foto do DEB teste está representada na figura 2. Nas setas de número 1,

observam-se fragmentos cromossômicos; na de número 2, figuras radiais e nas de número 3, quebras cromossômicas.

FIGURA 2: TESTE DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS INDUZIDAS PELO DIEPOXIBUTANO



FONTE: Loraine Veiga

Apesar do DEB teste apresentar excelente sensibilidade, especificidade e reprodutividade, é um teste trabalhoso e demorado. Além disso, pode ser falso negativo em pacientes com mosaicismo²².

Outro teste para o diagnóstico da AF é a detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 em linfócitos de sangue periférico pelo método de Western blot, descrito por Shimamura em 2002²³. Em indivíduos normais em que o complexo AF é completo, existe a monoubiquitinação da proteína FANCD2 normalmente e duas bandas são expressas no teste (forma longa e

curta). Nos indivíduos com AF, em que há alteração nas proteínas da AF à montante, não há a monoubiquitinação da proteína FANCD2 e no teste, somente uma banda é expressa (FANCD2-S- forma curta). Em indivíduos do grupo de complementação D2, nenhuma banda é expressa, pela ausência completa da monoubiquitinação. Nos pacientes em que a alteração está após a proteína FANCD2 (nas proteínas à jusante) e nos com mosaïcismo celular, esse teste é normal.

Normalmente, faz-se a combinação desses dois testes para o diagnóstico mais fidedigno da AF, entretanto quando eles são normais ou discordantes, pode-se fazê-los em células somáticas, como os fibroblastos²⁴.

O diagnóstico também pode ser feito diretamente pela análise dos grupos de complementação por métodos de hibridização somática²⁵ ou pela pesquisa de mutações específicas já conhecidas²⁶.

1.1.6 Grupos de Complementação da Anemia de Fanconi

Além da heterogeneidade fenotípica dos pacientes com AF, identificou-se a heterogeneidade genotípica. Através de métodos de hibridização somática, foram identificados subtipos de AF, denominados grupos de complementação do DNA²⁵. Até o momento foram identificados quinze grupos de complementação na AF (FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BCRA2, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI/BRIP1, FANCL, FANCM, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C e FANCP/SLX4)¹¹. A maioria dos genes dos grupos de complementação já foram identificados e estão demonstrados no quadro 2.

Mutações no gene FANCA, localizado no cromossomo 16, são as mais frequentes e mais de 100 tipos de mutação já foram descritas. A deleção 3788/3790 no gene FANCA ocorre em até 30% dos pacientes brasileiros e pode ser uma ferramenta importante no diagnóstico²⁷. As mutações nos genes com FANCC e FANCG são a segunda e a terceira mais frequentes. A distribuição entre os grupos de mutação também depende da etnia estudada. Mutações em diferentes genes podem resultar em manifestações clínicas semelhantes, entretanto algumas predisposições já foram observadas. Pacientes do grupo de complementação FANCD2 tendem a ter maior número de anormalidades físicas e falência medular mais precoce. Pacientes do grupo A tem sobrevida pior do que os dos grupos C e G. O subtipo D1/ BRCA2 tem predisposição a neoplasias de início precoce e evolução grave^{9,18}.

QUADRO 2- Grupos de Complementação, Gene Responsável e Ocorrência entre os Pacientes com Anemia de Fanconi

SUBTIPO	GENE RESPONSÁVEL	LOCALIZAÇÃO	ESTIMATIVA DE OCORRÊNCIA (%)
A	FANCA	16q24.3	57
B	FANCB (FAAP95)	Xp22.31	0,3
C	FANCC	9q22.3	15
D1	FANCD1/BRCA2	13q12-13	4
D2	FANCD2	3p25.3	3
E	FANCE	6p21-22	1
F	FANCF	11p15	2
G	FANCG/XRCC9	9p13	9
I	Não identificado	?	Raro
J	FANCI/BACH1/BRIP1	17q22-q24	1,6
L	FANCL/PHF9/POG(FAAP43)	2p16.1	0,1
M	FANCM/Het (FAAP250)	14q21.3	Raro
N	FANCN/PALB2		Raro
O	FANCO/RAD51C		Raro
P	FANCP/SLX4		Raro

FONTE: Adaptado de Taniguchi (2006).

1.1.7 Mosaicismo Celular

O mosaicismo ou reversão é o fenômeno genético em que existem duas populações celulares, uma normal e outra alterada, em um mesmo indivíduo. A correção celular ocorre de maneira espontânea pelos mecanismos de reversão gênica ou recombinação intragênica na célula tronco hematopoiética. O alelo mutado é corrigido e passa a ser funcionante, com normalização da função da proteína anormal e, conseqüentemente, do fenótipo celular. É possível que exista uma vantagem de crescimento da população normal, com progressiva substituição das células anormais da medula óssea, entretanto nem sempre a hematopoiese normal é estabelecida^{11,24}. O mosaicismo pode ocorrer em até 20% dos pacientes com AF e pode manifestar-se com resultados negativos no DEB teste ou pela presença de uma população com resistência aos agentes clastogênicos. Quando há uma forte suspeita clínica do diagnóstico de AF e o DEB teste é negativo, deve-se fazê-lo em fibroblastos, pois não existem evidências de mosaicismo em células somáticas²⁸. As conseqüências clínicas do mosaicismo não são totalmente definidas, mas parece haver um fenótipo hematológico mais brando. A predisposição a neoplasias parece não estar alterada dos indivíduos mosaicos nem a necessidade do TCTH^{11,24}, entretanto alguns estudos indicam uma maior incidência de falha de pega²⁹.

1.2- TRATAMENTO

1.2.1 Tratamento de suporte

Essa modalidade terapêutica é essencialmente paliativa e deve ser realizada enquanto se aguarda o tratamento definitivo que é o TCTH. Baseia-se no suporte transfusional e no controle das complicações infecciosas.

Pacientes com MFC graves e potencialmente fatais, como as atresias, devem ser tratados cirurgicamente assim que o diagnóstico for realizado.

O uso de andrógenos pode ser eficaz no controle da pancitopenia em até 50% dos pacientes, entretanto os benefícios são temporários e seu uso, além de predispor a neoplasia hepática, pode afetar negativamente o resultado do TCTH. Os fatores estimuladores como eritropoietina e G-CSF também têm efeitos transitórios³⁰.

Nos pacientes com neoplasias hematológicas ou epiteliais, o tratamento deve ser realizado de maneira cautelosa e com doses reduzidas de quimio e/ou radioterapia, devido à alta sensibilidade das células AF.

1.2.2 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas

O TCTH é o único tratamento curativo para a falência medular, bem como da mielodisplasia e leucemia mielóide aguda nos pacientes com AF, entretanto não previne às neoplasias secundárias.

Inicialmente os regimes de condicionamento eram baseados em ciclofosfamida 200mg/kg com ou sem radioterapia, entretanto resultavam em elevada mortalidade relacionada ao tratamento (MRT), doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) e baixa sobrevida^{5,31}. Após a confirmação *in vitro* das instabilidades cromossômicas e a sensibilidade aumentada aos agentes citotóxicos, passou-se a utilizar regimes de condicionamento de intensidade reduzida³². Gluckman e colaboradores propuseram o uso de 60 mg de ciclofosfamida com dose única de radiação tóraco-abdominal de 500cGy e houve redução importante da MRT³³. A partir de então, esse regime de condicionamento passou a ser amplamente difundido e utilizado, com taxas de

sobrevida global acima de 80% em 3 anos. Entretanto, a DECH aguda e crônica, o retardo no crescimento e as neoplasias secundárias continuaram a ser um problema^{14,34-37}. Deeg e colaboradores mostraram a ocorrência de 40% de neoplasia secundária entre dez e quinze anos após o TCTH³⁴. Com objetivo de reduzir a incidência de neoplasia secundária e o retardo no crescimento, diversos grupos eliminaram a radioterapia do regime de condicionamento, substituindo-a por baixas doses de ciclofosfamida isolada nos pacientes com doadores aparentados, ou associada à fludarabina e/ou imunoglobulina anti timocítica, nos pacientes com doadores não aparentados³⁸⁻⁴². Pasquini et al demonstraram recuperação hematológica, ocorrência de DECH aguda e crônica e mortalidade semelhante entre os grupos de pacientes que utilizaram radioterapia ou não no regime de condicionamento⁴³.

A maioria dos pacientes não apresenta doador aparentado, necessitando de TCTH com doadores alternativos. O grupo francês foi o primeiro a relatar sua experiência em transplante com doadores não aparentados na AF, e mostrou uma sobrevida global de 30% em 5 anos, com incidência cumulativa de falha de pega de 24%⁴⁴. Desde então, diversos grupos vêm utilizando doadores alternativos, com medula óssea (MO) e sangue de cordão umbilical (SCU) como fonte de células. Em transplantes utilizando-se medula óssea, os resultados de sobrevida global variam de 33% em 3 anos⁴⁵ até 52% quando a fludarabina é utilizada no regime de condicionamento⁴⁶. Já com sangue de cordão umbilical, Gluckman et al, encontraram uma diferença significativa na SG de acordo com número de incompatibilidades. Nos transplantes compatíveis a SG foi de 74%±13% e 25%±7% quando o enxerto apresentava um grau de incompatibilidade³⁹.

1.3 FALHA DE PEGA

A falha de pega (FP) do enxerto é uma das complicações mais graves após transplante e com elevada morbi-mortalidade, embora seja um fenômeno raro. Caso um segundo transplante não seja realizado com rapidez, a maioria dos pacientes irá evoluir a óbito em decorrência de infecções ou sangramentos. Por outro lado, nem sempre é possível se realizar um segundo procedimento, especialmente quando se utiliza um doador não aparentado, seja pela indisponibilidade de um novo doador ou por falta de condições clínicas do paciente. Dentre as estratégias para tratamento da FP estão: uso de fatores de crescimento, infusão de medula óssea autóloga quando esta é armazenada previamente, utilização do mesmo doador com um regime de condicionamento e ou imunossupressão diferente, o uso de SCU devido a maior rapidez de acesso e tolerância de incompatibilidades ou transplante haploidêmico⁴⁷.

A definição de FP é uma contagem de neutrófilos abaixo de $500/\text{mm}^3$ no dia 28 após o transplante quando a fonte de células é a medula óssea. Quando o sangue de cordão umbilical é utilizado, a definição de FP é menos definida na literatura, uma vez que a pega tardia é um evento frequente. A maioria dos centros de transplante considera a FP quando há ausência de 500 neutrófilos no dia 42 após a infusão da CTH⁴⁸. A ausência de células do doador na análise do quimerismo por PCR, associada à neutropenia persistente confirma o diagnóstico de FP. Entretanto, mesmo que haja células do doador na análise do quimerismo, se não existir o critério hematológico de pega do enxerto (500 neutrófilos), faz-se o diagnóstico de FP.

A FP pode ser primária quando há ausência de enxertia das células do doador ou secundária (rejeição) nos casos em que ocorre a redução progressiva ou perda das células do doador após uma pega inicial.

Existem fatores de risco sabidamente relacionadas com uma maior incidência de falha de pega do enxerto ou rejeição após o TCTH e podem estar relacionadas ao paciente, ao doador ou ao regime de condicionamento. As principais variáveis relacionadas ao paciente baseiam-se na sensibilização prévia, por meio de gestações ou transfusões sanguíneas previamente ao TCTH⁴⁹. Os fatores de risco para FP relacionados ao doador são a utilização de doadores não aparentados ou com incompatibilidades HLA, sangue de cordão umbilical e baixo número de células nucleadas totais (CNT) ou células CD34. A incompatibilidade ABO maior também foi apontada como uma possível causa de FP. Entretanto, essa avaliação é muito difícil nos estudos clínicos, pois, frequentemente está associada a outras situações que também predis põem à falha de enxertia. O regime de condicionamento e imunoprofilaxia também podem interferir na pega do enxerto, os condicionamentos de intensidade reduzida ou com depleção de células T estão relacionados à FP, assim como a ausência de um inibidor da calcineurina no esquema de profilaxia. A utilização de medicamentos mielotóxicos, infecções virais por citomegalovírus, herpes vírus do tipo 6, 8, parvovírus ou sequestro esplênico também foram descritos como fatores de risco para FP^{47,50-52}.

A patogênese da FP não é totalmente definida, mas acredita-se que a imunidade celular e humoral estejam envolvidas. O mecanismo humoral parece ser a primeira barreira à pega do enxerto. Em um modelo animal, foi demonstrado que anticorpos previamente formados estão envolvidos com a FP

precoce, pois eles não seriam afetados pelos regimes de condicionamento⁵³. A rejeição celular ocorre devido a células T e NK (natural killer cells) do receptor resistentes ao regime de condicionamento. Essas células reconhecem antígenos de superfície HLA das células tronco hematopoiéticas do doador e as destroem, reação denominada hospedeiro-versus-enxerto⁵¹.

A rejeição mediada por células NK ocorre dentro de 1 ou 2 dias após o transplante e não requer sensibilização prévia. A vida média dessas células é de 7 dias, entretanto são muito resistentes à radiação e ciclofosfamida⁵⁰.

Ao contrário, a rejeição por células T necessita estímulo prévio e normalmente ocorre após o sétimo dia do transplante. Os linfócitos T têm vida média maior do que as células NK e geralmente são mais sensíveis à radiação. A ativação das células T ocorre através do reconhecimento da presença de moléculas “nonself” do complexo maior de histocompatibilidade ou de peptídeos antigênicos nas células alvo⁵⁰⁻⁵². O mecanismo de apoptose das CTH pelos linfócitos T citotóxicos e células NK ocorre através de vias citolíticas Fas/FasL e perforina/granzina. Durante o TCTH há produção de TNF-alfa e INT-gama que estimulam a expressão da proteína Fas na membrana das CTH. O ligante do Fas ou CD178 que é encontrado em linfócitos T ativados, neutrófilos e macrófagos, liga-se ao receptor Fas na membrana da CTH e desencadeia sua apoptose. A perforina e granzina são moléculas presentes nos linfócitos T citotóxicos e células NK e permanecem armazenadas na forma de grânulos no citoplasma. Quando as células reconhecem um alvo, há a liberação dos grânulos com a destruição celular^{50,51}.

2- OBJETIVOS

O objetivo principal desse estudo foi avaliar os fatores de risco para o desenvolvimento de falha primária e secundária de pega do enxerto em pacientes com Anemia de Fanconi submetidos a TCTH.

Os objetivos secundários são analisar a incidência cumulativa de falha de pega, sobrevida global e evolução clínica dos pacientes que apresentaram falha primária ou secundária de pega.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Pacientes

Entre janeiro de 1985 e outubro de 2011, duzentos e trinta e oito pacientes com anemia de Fanconi foram submetidos ao TCTH no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Cento e cinquenta e um transplantes aconteceram a partir do ano 2000. Todos os pacientes estavam em fase de aplasia, sem evidência de leucemia mielóide ou mielodisplasia no momento do transplante.

Vinte e quatro pacientes evoluíram a óbito antes do trigésimo dia do procedimento, devido a complicações infecciosas ou sangramentos em sistema nervoso central e pela impossibilidade de avaliação de pega medular foram excluídos dessa análise. Duzentos e doze pacientes puderam ser avaliados quanto à pega medular e foram divididos em três grupos. O primeiro grupo (G1) incluiu pacientes que apresentaram falha primária de pega (FPP) e foi formado por 25 pacientes. O segundo (G2) foi composto por 9 pacientes que tiveram falha secundária de pega ou evoluíram para leucemia. O terceiro grupo (G3) foi formado pelos pacientes que apresentaram pega medular sustentada (PMS) e foi constituído por 178 pacientes. Com relação à extensão das anormalidades físicas, a análise foi baseada no estudo de Guardiola⁴⁵, que classificou o número de malformações congênitas por sistemas. As alterações cutâneas não foram consideradas para avaliar a extensão da doença, uma vez que a maioria dos pacientes apresenta esse envolvimento. Cada uma das áreas descritas a seguir foi considerada como um sítio anatômico envolvido. Pacientes com

envolvimento de menos de 1 ou 2 sistemas foram considerados como portadores de doença limitada e com 3 ou mais sistemas como doença extensa.

1) Cabeça: incluindo anormalidades nos olhos (olhos pequenos, estrabismo, epicanto, hipertelorismo); orelhas (surdez, alterações de formato, no ouvido médio, atresia, displasia); face (microcefalia, micrognatismo, face triangular); pescoço (curto, anormalidade de Sprengel).

2) Membros: incluindo anormalidades nos quirodáctilos ou rádio (ausência, hipoplasia, bífido), hipoplasia tenar, clinodactilia, sindactilia, presença de dedo extra numerário, ausência primeiro metacarpo, anormalidades dos dedos ou dedos finos, displasia ulnar.

3) Renal

4) Trato gastro-intestinal

5) Trato gênito-urinário

6) Sistema cardio-pulmonar

3.2 METODOLOGIA

O diagnóstico da AF foi baseado nas características clínicas associada a um número aumentado de quebras no exame de citogenética após exposição ao diepoxibutano (DEB). A avaliação inicial também incluiu mielograma, biópsia de medula óssea e citogenética convencional para pesquisa de alterações clonais definidas pela presença de duas ou mais células com a mesma alteração estrutural ou cromossomo extra, ou três ou mais células com a mesma perda cromossômica. A evolução para leucemia foi diagnosticada pela presença de >20% de blastos na análise da medula óssea.

As doses da ciclofosfamida do regime de condicionamento foram progressivamente reduzidas no decorrer dos anos com o intuito de diminuir a toxicidade. De 1988 até 1997 as doses diminuíram de 200 para 60mg/kg, sendo que a partir de 1998, essa foi a dose padrão sendo dividida em 4 dias. Para pacientes com doadores NAP, a fludarabina na dose de 125mg/m² dividida em 5 dias e a timoglobulina 5mg/kg dividida em 3 dias foram associadas à ciclofosfamida no condicionamento. A radioterapia foi utilizada em uma minoria dos pacientes com doses variando de 200 a 1320 Rads. Como imunoprofilaxia, a ciclosporina foi utilizada na dose de 3mg/kg dividida em duas vezes ao dia, a partir do dia anterior à infusão da CTH. O metotrexato foi utilizado na dosagem de 15mg/m² no dia +1 e 10mg/m² nos dias +3,+6 e +11, na ausência de mucosite ou toxicidade hepática grave. O corticoide (metilprednisolona) e micofenolato de mofetila foram usados em poucos pacientes, nas doses de 1mg/kg e 15mg/kg, respectivamente.

A indicação para a transfusão de concentrado de hemácias e plaquetas baseava-se na sintomatologia do paciente associado a valor de hemoglobina abaixo de 8g/dL e plaquetas abaixo de 20.000 u/L, respectivamente. Durante o período de internação, os pacientes foram isolados em quartos individuais com filtro HEPA e receberam a profilaxia antimicrobiana com aciclovir para infecção por herpes vírus, sulfametoxazol e trimetropim para *Pneumocistis carini* e fluconazol para infecções fúngicas. Pacientes com sorologia negativa para citomegalovírus antes do transplante recebiam apenas hemocomponentes CMV negativos ou leucodepletados.

A pega do enxerto foi definida como contagem de neutrófilos acima de 500/mm³ por três dias consecutivos. A falha de pega foi definida como ausência

de recuperação neutrofílica até o dia 21 após o TCTH para MO ou 42 dias para SCU, associada à ausência de células do doador na análise do quimerismo.

Falha de pega secundária foi definida como retorno da pancitopenia após uma pega inicial e queda da porcentagem de células do doador no quimerismo.

A análise do quimerismo foi realizada pelo método VNTR (variable number tandem repeats) até agosto de 2009 e a partir dessa data pelo método de análise de fragmentos com marcadores STR (short tandem repeats).

Pacientes e doadores foram tipificados para HLA-A e B com métodos sorológicos e métodos de alta resolução moleculares para HLA- DRB1 através do PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers) e o PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide). A pesquisa de anticorpos anti HLA foi realizada pelo método de ELISA até o ano de 2005 e a partir de então, pelo método Labscreen.

Este estudo foi autorizado pelo comitê de ética local (Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos – CEP), com a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se tratar de estudo retrospectivo, embora assegurado que o caráter anônimo dos pacientes será mantido e que suas identidades serão protegidas. Número de registro no CEP- HC 2293.187/2010-07.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação da associação de variáveis qualitativas com a condição de pega foi considerado o teste de Qui-quadrado e para as variáveis quantitativas foi considerado o modelo de análise de variância com um fator (ANOVA) ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A condição de

normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Para a avaliação da associação de variáveis foi considerado o modelo de Regressão Logística. Para a descrição do tempo de sobrevida e da incidência cumulativa de falha de pega foram construídas curvas de Kaplan-Meier e ajustado um modelo de Regressão de Cox (com critério *stepwise* para seleção do modelo). Foram incluídas no modelo inicial as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,20$ na análise univariada. Para a comparação entre curvas de sobrevida foi usado o teste de Log-rank. Para a determinação de pontos de corte de variáveis quantitativas foram ajustadas curvas ROC. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

4. RESULTADOS

Na tabela 1 estão descritas as características dos 212 pacientes com AF submetidos a TCTH neste serviço, no período de 1985 a 2011 que tiveram sobrevida acima de 30 dias em que a pega medula pôde ser analisada.

TABELA 1: Características dos Pacientes Submetidos a TCTH no HC-UFPR

	G1 n= 25	G2 n=9	G3 n=178	p
Mediana Idade ao Diagnóstico	5 anos (1-12,3)	11 anos (5,1-34)	7 anos (1-34,9)	<0,001 ^a
Mediana Idade no TCTH	9 anos (4,7-19,2)	14,1 anos (8-34,9)	9 anos (3-34,9)	<0,001 ^b
Sexo				
Masc/Fem	16/10	4/5	86/92	0,766
Anormalidades Congênitas				0,650
< 3: Limitada	19	8	146	
≥ 3: Extensa	6	1	32	
Mediana Duração da Doença (em meses)	45,5 (9,8-124,6)	35,4 (2,8-126,3)	18,4 (0,1-121,6)	0,001 ^c
Mediana Unidades Transfusões Prévias	43 (0-101)	17 (2-101)	7 (0-151)	< 0,001 ^d
Uso Prévio Andrógenos	72% (n=15)	66,6% (n=6)	33% (n=59)	0,003 ^e
Mediana CNT x10 ⁹ /kg	4,4 (0,5-8,2)	4,9 (3-6,5)	4,5 (0,9-19,3)	0,498
Mediana CD34 x10 ⁶ /kg	1,7 (0,5-5,3)	0,5 (0,1-3,3)	2,1 (0,02-16,5)	0,185
Positividade CMV	12 (48%)	5 (55%)	108 (60%)	0,596
Citogenética alterada ao diagnóstico	60% (n=15)	20% (n=4)	14% (n=120)	0,001 ^f
HEMOGRAMA INICIAL				
Mediana Hemoglobina (g/dL)	8,1 (4-9- 13,2)	7,7 (4-11,2)	8,8 (3,2-9,8)	0,442
Mediana Contagem Leucócitos x 10 ³ /uL	4,4 (1,3-9,8)	2,6 (1,2-4,2)	3,7 (1,1-10,8)	0,023 ^g
Mediana Contagem Neutrófilos%	26 (14-66)	23,5 (18-80)	28 (5-89)	0,929
Mediana Contagem Plaquetas x 10 ³ /uL	35 (4-457)	52 (15-160)	31 (10-326)	0,216
Mediana Neutrófilos na Internação (x 10 ³ /uL)	651 (64-2880)	739 (112-2714)	804 (0-11400)	0,660
Mediana Plaquetas Internação (x 10 ³ /uL)	21 (3-75)	27 (11-102)	33 (1-334)	0,020 ^h

a: p<0,001 comparação entre G1xG2 e G2xG3; p=0,036 entre G1xG3

b: p<0,001 comparação entre G1xG2 e G2xG3; p=0,640 entre G1xG3

c: p<0,001 comparação entre G1xG3; p=0,094 G1xG2 e p=0,577 entre G2xG3

d: p<0,0001 comparação entre G1xG3; p=0,016 entre G2xG3 e p=0,459 entre G1xG2

e: p=0,002 comparação entre G1xG3; p=0,158 entre G2xG3 e p=1 entre G1xG2

f: p<0,001 comparação entre G1xG3; p=0,302 entre G1xG2 e p=0,525 entre G2xG3

g: p=0,005 comparação entre G1xG2; p=0,022 entre G2xG3 e p=0,151 entre G1xG3

h: p=0,005 comparação entre G1xG3; p=0,279 entre G1xG2 e p=0,631 entre G2xG3

A mediana de seguimento para o grupo 1 foi de 3,4 meses (0,9-45,3), do grupo 2 de foi 22,2 meses (3-94,2) e no grupo 3 foi de 27 meses (1,1- 216,1).

Os grupos foram semelhantes entre si nas seguintes variáveis: distribuição entre os sexos, severidade da doença, mediana de CNT e CD34 infundidas, valor mediano de hemoglobina, plaquetas e neutrófilos ao diagnóstico, valor mediano de neutrófilos na internação e status do CMV. A mediana de idade foi mais elevada no momento do diagnóstico e no transplante no grupo 2. A duração de doença foi mais prolongada nos grupos 1 e 2 e consequente a isso, o número de transfusões foi superior nesses grupos. O uso de andrógenos foi maior nos pacientes do grupo com FPP, assim como a ocorrência de citogenética alterada. A mediana de contagem de leucócitos ao diagnóstico foi menor no grupo 2 e a mediana de plaquetas na internação foi menor no grupo 1.

A partir do ano 2000 houve do aumento do número de TCTH com doadores não aparentados, com incompatibilidades HLA e com o SCU como fonte de células. Apesar disso, não houve diferença na incidência de FP entre os períodos de 1985 e 1999 ou após o ano de 2000.

Na tabela 2 estão representadas as características dos doadores entre os grupos. A maioria dos pacientes do grupo 1 recebeu transplante com doadores NAP, enquanto os outros grupos, com doadores aparentados irmãos.

TABELA 2- Características dos Doadores

	GRUPO 1 (n=25)	GRUPO 2 (n=9)	GRUPO 3 (n=178)
IRMÃO	3 (12%)	6 (66,7%)	103 (57,8%)
OUTROS	1 (4%)	2 (22,2)	16 (8,9)
NAP	21 (84%)	1 (11,1)	59 (33,3)

p<0,001 entre G1xG3

A tabela 3 mostra os dados referentes à compatibilidade HLA dos doadores. O grupo com FPP apresentou maior proporção de doadores com incompatibilidades, 40% da amostra apresentou um grau de incompatibilidade e 32% duas incompatibilidades HLA. No grupo 2 todos os pacientes tinham compatibilidade HLA completa e no grupo com PMS, apenas 18% apresentaram incompatibilidades.

TABELA 3- Compatibilidade HLA dos Doadores

	GRUPO 1 (n=25)	GRUPO 2 (n=9)	GRUPO 3 (n=178)
COMPATÍVEL	7 (28%)	9 (100%)	146 (82%)
1 INCOMP	10 (40%)		22 (12%)
2 INCOMP	8 (32%)		10 (6%)

p <0,001 entre G1xG2 e G1xG3. p=0,362 entre G2xG3
INCOMP= incompatibilidade

As fontes de CTH estão demonstradas na tabela 4. A maioria dos pacientes do grupo 1 recebeu SCU, enquanto nos outros grupos a MO foi a fonte de célula mais utilizada.

TABELA 4 – Fonte de Células Tronco Hematopoéticas

	GRUPO 1 (n=25)	GRUPO 2 (n=9)	GRUPO 3 (n=178)
MO	11 (44%)	9 (100%)	155 (87%)
SCU	14 (56%)		23 (13%)

p<0,001 entre G1xG3 e G1xG2. p=0,604 entre G2xG3

O regime de condicionamento foi baseado em ciclofosfamida isolada nos pacientes transplantados com doadores AP e em fludarabina nos NAP. Cinco pacientes do grupo 1 e 7 do grupo 3 receberam TBI como parte do esquema de

condicionamento, associados ou não à fludarabina. A distribuição dos regimes de condicionamentos entre os grupos está demonstrada da tabela 5.

TABELA 5- Regimes de Condicionamento

	GRUPO 1 (n=25)	GRUPO 2 (n=9)	GRUPO 3 (n=178)
CFA	7 (28%)	8 (88,8%)	106 (60%)
CFA+FLU+ATG	12 (48%)		51 (28%)
OUTROS COM FLU	3 (12%)	1 (11,1%)	14 (8%)
OUTROS SEM FLU	3 (12%)		7 (4%)
INCLUINDO TBI	5 (20%)		7 (4%)

p=0,022 entre G1xG2 e G1xG3. p=0,720 entre G2xG3

CFA= ciclofosfamida. FLU= fludarabina. ATG= timoglobulina TBI= irradiação corporal total

A imunoprofilaxia da DECH foi semelhante entre os grupos e baseada em ciclosporina e metotrexato na maior parte dos pacientes, conforme a tabela abaixo.

TABELA 6- Regimes de Imunoprofilaxia

	GRUPO 1 (n=25)	GRUPO 2 (n=9)	GRUPO 3 (n=178)
CSA+ MTX	16 (64%)	8 (88,8%)	150 (84%)
OUTROS	9 (36%)	1 (11,1%)	28 (16%)

CSA= ciclosporina. MTX metotrexato

Para a determinação dos fatores associados à falha medular foi utilizado o modelo de regressão de Cox e os resultados estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 7). A presença de incompatibilidades HLA, utilização de doadores NAP, ausência de fludarabina no regime de condicionamento, uso prévio de andrógenos, mais de 10 unidades de transfusões previamente ao

transplante e maior idade no momento do transplante estiveram associados à maior ocorrência de falha de pega.

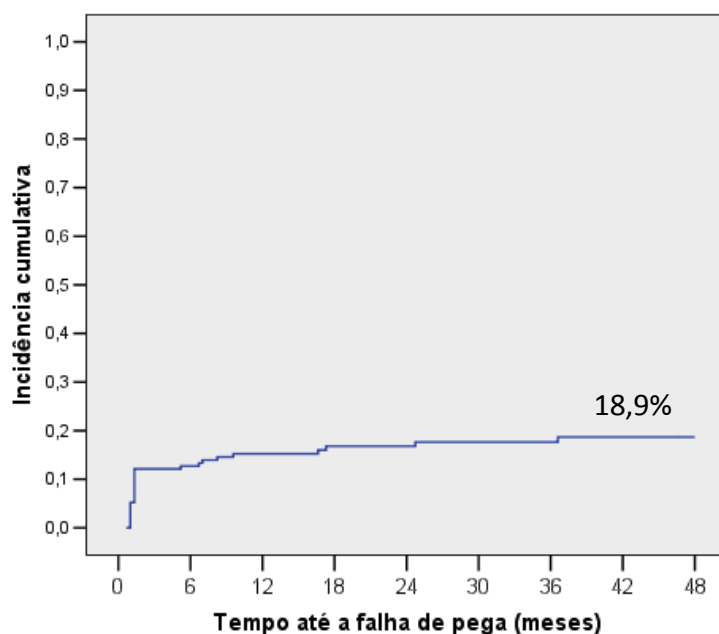
Tabela 7- Fatores Associados à Falha de Pega

VARIÁVEL	HR	IC 95%		p
IDADE TMO	1,08	1,02	1,14	0,010
DOADOR NAP	4,39	1,34	14,39	0,015
>10TRANSFUSÕES	3,67	1,35	9,97	0,011
AUSENCIA FLU	3,43	1,38	8,54	0,008
INCOMPATILIDADE HLA	3,08	1,20	7,90	0,019
USO ANDRÓGENOS	2,35	1,05	5,30	0,039

NAP= não aparentado. FLU= fludarabina. HR= hazard ratio. IC= intervalo de confiança

A incidência cumulativa (IC) de falha de pega em 12, 24 e 36 meses foi de 15,3%, 17,8% e 18,9%, respectivamente. A curva está representada no gráfico 1.

Gráfico 1- Incidência Cumulativa de Falha de Pega



A IC de FP entre doadores aparentados foi de 7,63% aos 12 meses e 10,9% aos 24 meses. Com doadores NAP, a IC foi de 28,19% aos 12 e 24 meses. Quando a MO foi a fonte de células, a IC para FP foi de 14,3% e 40% quando o SCU foi utilizado. As curvas estão representadas nos gráficos a seguir.

Gráfico 2- IC de Falha de Pega de acordo com Tipo de Doador

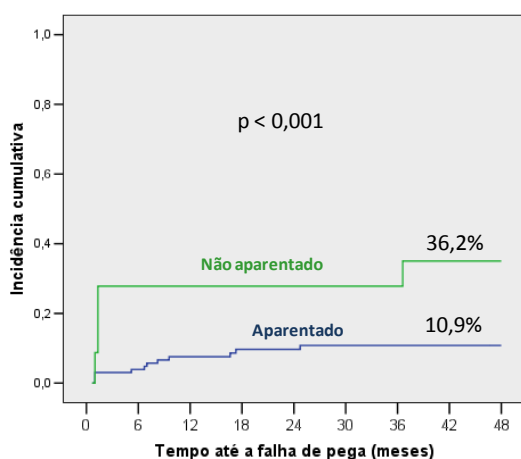
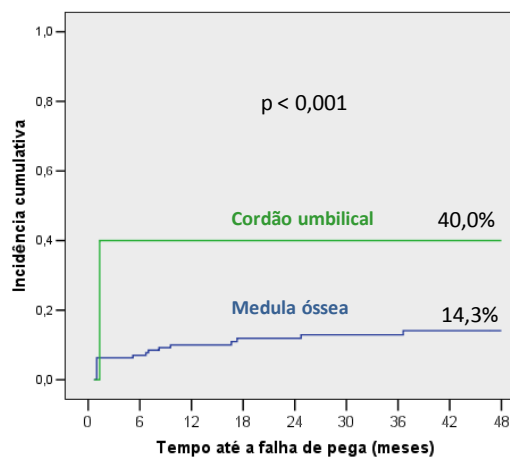


Gráfico 3- IC de Falha de Pega de acordo com a Fonte de CTH



4.1 GRUPO 1- FALHA PRIMÁRIA DE PEGA

A maioria dos pacientes neste grupo recebeu transplante com doadores não aparentados (n=21), sendo 7 com MO e 14 com SCU. Dentre os pacientes que receberam MO, 4 eram totalmente compatíveis e 3 pacientes tinham 1 grau de incompatibilidade HLA (2 em classe I e 1 em classe II). Todos os SCU apresentavam incompatibilidades, 6 pacientes tinham 1 incompatibilidade (5 em classe I e 1 em classe II) e 8 apresentavam duas incompatibilidades (4 com duas incompatibilidades em classe I e 4 pacientes com 1 incompatibilidade em classe I e uma em classe II).

Quatro pacientes foram transplantados com doadores aparentados, 3 com irmãos totalmente compatíveis e um com a mãe que tinha 1 incompatibilidade em classe I.

Quinze pacientes tiveram a análise citogenética realizada e em 7 foram encontradas as seguintes alterações clonais: deleção cromossomo 5, 7 e 10, trissomia cromossomo 11, duplicação braço longo cromossomo 1 e material adicional no braço longo do cromossomo 7. Oito pacientes foram tipificados quanto ao grupo complementar da AF, sendo 5 pacientes FANC-A, 2 FANC-G e 1 FANC-E. Nove pacientes realizaram a pesquisa de anticorpos anti HLA. Em 5 casos a pesquisa foi positiva com anticorpos anti HLA classe I e II e apenas um paciente apresentou anticorpos anti-HLA específicos contra antígenos do doador.

Como todos os pacientes receberam regimes de condicionamento mieloablativo, não houve recuperação autóloga em nenhum caso. Cinco pacientes que receberam transplante com doadores NAP foram a óbito antes de um segundo doador ser encontrado, 2 haviam recebido MO e 3 SCU. As causas de óbito foram infecções bacterianas ou fúngicas em todos os pacientes. Vinte pacientes receberam um segundo transplante, 4 eram com doadores aparentados e foram transplantados novamente com os mesmos doadores. Dois pacientes foram a óbito em decorrência de infecções (aspergilose e toxoplasmose disseminada) antes da avaliação da pega e os outros 2 apresentaram FP novamente. Um desses pacientes recebeu um terceiro TMO com um doador aparentado diferente e apresentou pega medular adequada, encontra-se vivo, com DECH crônico controlado e seguimento de 45 meses. Devido à indisponibilidade de um doador aparentado diferente, o outro

paciente com a segunda FP foi submetido a um transplante haploidêntico com a mãe, evoluiu com DECH agudo grau 4 de intestino, atualmente controlado e encontra-se bem com seguimento de 4 meses. Dos dezesseis pacientes que receberam TCTH com doadores NAP, 5 haviam recebido MO e 11 SCU. Doze pacientes realizaram um segundo TCTH com doadores diferentes, apenas 3 apresentaram pega do enxerto e 2 estão vivos com uma mediana de seguimento de 543 dias (326-720). Todos os que receberam um novo transplante com o mesmo doador tiveram FP novamente.

Na análise univariada os fatores associadas a uma maior FPP foram: maior duração de doença ($p < 0,001$), maior número de unidades transfundidas ($p < 0,001$), presença de incompatibilidades HLA ($p < 0,001$), utilização de doador NAP ($p < 0,001$), SCU como fonte de células ($p < 0,001$), condicionamento sem fludarabina ($p = 0,022$), citogenética alterada ao diagnóstico ($p < 0,001$) e uso prévio de andrógenos ($p = 0,003$). Devido ao grande número de dados indisponíveis de citogenética e uso de andrógenos, essas variáveis foram excluídas na análise multivariada.

A análise multivariada dos critérios acima mostrou que um maior número de transfusões ($p = 0,003$), a utilização de doadores NAP ($p = 0,001$) ou com incompatibilidades HLA ($p = 0,025$) ou a ausência de fludarabina no regime de condicionamento ($p = 0,005$) estão associados a uma maior chance de falha primária de pega. Esses dados estão representados na tabela 8.

TABELA 8- Análise Multivariada para Falha Primária de Pega

VARIÁVEL	OR	IC 95%		p
DOADOR NAP	19,99	3,18	125,75	0,001
TRANSFUSÕES	1,03	1,01	1,05	0,003
NÃO COMPATÍVEL	6,66	1,26	35,09	0,025
NÃO FLUDARABINA	13,5	2,13	85,57	0,005

OR= odds ratio. IC= Intervalo de Confiança. NAP= não aparentado

Foi observada uma grande associação entre o uso de fludarabina e transplantes NAP e com incompatibilidades; dessa forma foi ajustado o modelo multivariado sem a presença das variáveis, uso de fludarabina e compatibilidade HLA. Na tabela abaixo são apresentados esses valores.

(Tabela 9) Com a exclusão das referidas variáveis, houve uma tendência a que a variável SCU apresentasse significância estatística na relação com a falha de pega primária ($p=0,063$).

TABELA 9- Análise Multivariada Ajustada

VARIÁVEL	OR	IC 95%		p
DOADOR NAP	5,43	1,30	22,76	0,020
TRANSFUSÕES	1,03	1,01	1,05	0,003
SCU	3,56	0,93	13,67	0,063

SCU= sangue de cordão umbilical

Os resultados indicaram que um maior número de transfusões está associado a uma maior probabilidade de falha de pega medular. O valor de unidades de transfusões associada a uma maior FP foi de 10 unidades. O aumento de uma unidade de transfusão previamente ao transplante leva a um acréscimo de 3% na odds ratio a favor de não pega medular.

4.2 GRUPO 2- FALHA SECUNDÁRIA DE PEGA OU EVOLUÇÃO PARA LEUCEMIA

Este grupo foi composto por 3 pacientes que apresentaram pega medular e evoluíram para leucemia mielóide aguda (LMA) e 6 pacientes com falha secundária de pega. Todos os pacientes receberam MO como fonte de células com compatibilidade HLA completa.

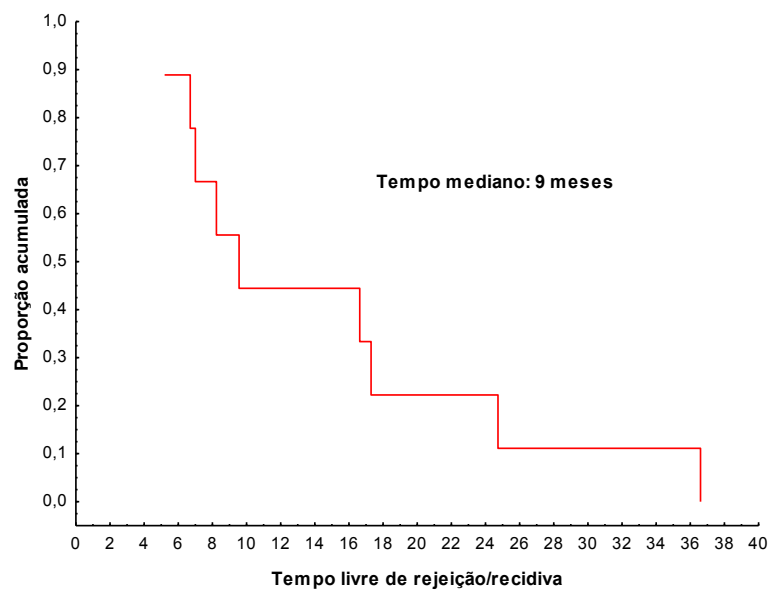
A mediana de tempo para a evolução para LMA foi de 325 dias após o TCTH, variando de 210 a 519 dias. Todos os pacientes receberam transplantes de doadores irmãos com ciclofosfamida isolada no regime de condicionamento. Apenas um deles apresentava sinais de displasia no mielograma inicial e a citogenética não apresentou metáfases; os outros tinham pancitopenia e citogenética normal ao diagnóstico. Esses pacientes não pertenciam a um grupo específico de complementação. Dois pacientes receberam tratamento quimioterápico para indução de remissão e o terceiro foi novamente submetido a transplante, no entanto todos faleceram por complicações infecciosas.

Seis pacientes desse grupo apresentaram falha secundária de pega com uma mediana de 456 (156-1098) dias após o TCTH. Um paciente apresentava trimossomia do cromossomo 7 na avaliação do diagnóstico, a citogenética dos demais pacientes era normal. Somente um paciente havia recebido transplante com doador NAP. Para este caso, o condicionamento foi com ciclofosfamida, fludarabina e TBI e ele faleceu antes de um novo procedimento ser realizado. Todos os outros pacientes receberam condicionamento com ciclofosfamida isolada. Dois pacientes foram transplantados com doadores parentes não irmãos (prima e avô) e puderam ser resgatados com um segundo transplante com os mesmos doadores e encontram-se vivos com um seguimento de 1896

e 2827 dias. Três pacientes haviam recebido transplante de irmãos totalmente compatíveis, entretanto 2 faleceram antes da realização de um novo procedimento, as causas de óbito foram infecção e hemorragia em sistema nervoso central. O outro paciente realizou um novo transplante e faleceu em decorrência de DECH crônica.

A incidência cumulativa de falha secundária de pega/leucemia foi de 3,58% aos 12 meses e 6,39% aos 24 meses. A sobrevida livre de eventos mediana foi 9 meses e está representada no gráfico a seguir.

GRÁFICO 4: Sobrevida Livre de Eventos no Grupo 2



A análise univariada mostrou que uma maior idade do momento do transplante ($p < 0,001$), menor contagem de leucócitos ao diagnóstico ($p = 0,021$) e maior número de transfusões prévias ($p = 0,022$) estão associadas à FSP. Na análise multivariada, esses fatores foram testados e indicaram que pacientes com mais idade tendem a ter maior probabilidade de pega não sustentada

($p=0,063$), assim como aqueles com valores mais baixos de leucócitos totais ao diagnóstico ($p=0,091$), dados estão demonstrados na tabela 10.

Independente dessas variáveis, um maior número de transfusões (> 10 unidades) está associado a uma maior probabilidade de pega não sustentada. O acréscimo de uma unidade de transfusão leva a um acréscimo de 2% na odds ratio a favor de pega não sustentada.

TABELA 10- Análise Multivariada para Falha Secundária de Pega/Leucemia

VARIÁVEL	OR	IC 95%	p	
IDADE TMO	1,10	0,99	1,21	0,063
LEUCÓCITOS*	0,54	0,26	1,11	0,091
TRANSFUSÕES	1,02	1,00	1,05	0,032

* Contagem de leucócitos ao diagnóstico

4.3 GRUPO 3- PEGA MEDULAR ADEQUADA

Neste grupo estão os 178 pacientes que apresentaram pega medular adequada e sustentada. A mediana de pega neutrofílica foi de 19 dias (10-117) e plaquetária de 21 dias (12-1807). O grupo foi constituído por doadores aparentados compatíveis em sua maioria e em consequência disso, apresentou duração de doença mais curta, níveis hematológicos mais elevados e menor número de transfusões no momento do TCTH. Cinquenta e nove pacientes receberam TCTH com doadores NAP sendo 21 com SCU. Apenas 3 unidades de SCU eram totalmente compatíveis, todas as outras apresentavam ao menos uma incompatibilidade HLA. Medula óssea foi utilizada em 38 pacientes e 31 eram totalmente compatíveis. O regime de condicionamento foi ciclofosfamida

isolada em 60% dos pacientes, 36% baseado em fludarabina e apenas 7 pacientes receberam TBI.

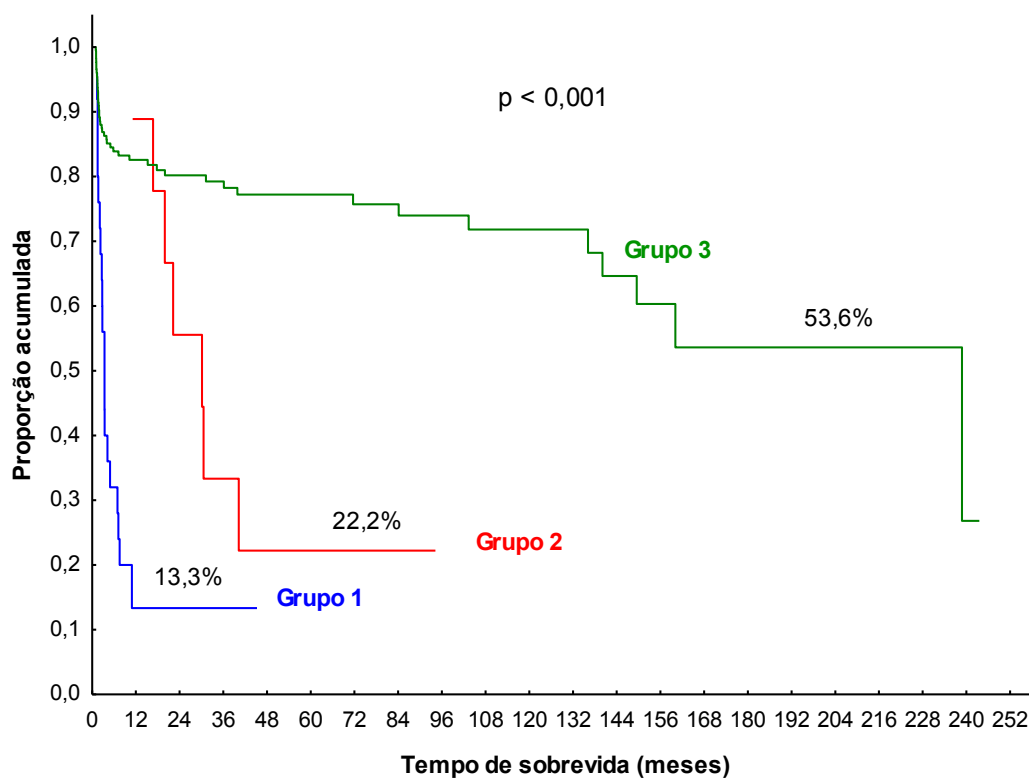
Oitenta por cento dos pacientes tinham menos de 3 sistemas afetados, configurando doença limitada. A citogenética foi normal em 60% da amostra e 59 pacientes (33%) haviam recebido tratamento prévio com andrógenos.

Com relação à evolução, 133 pacientes estão vivos com uma mediana de 779 dias de seguimento (20-7307). Quarenta e quatro pacientes foram a óbito, sendo as principais causas infecções (25%), DECH aguda (22%), DECH crônica (17%) e neoplasias secundárias (17%).

4.4 SOBREVIDA

A sobrevida global dos três grupos está apresentada no gráfico a seguir.

GRÁFICO 5: Sobrevida Global entre os Grupos



Grupo1 x Grupo 2: 0,002 Grupo1 x Grupo3: < 0,001 Grupo2 x Grupo3: 0,002

5. DISCUSSÃO

Apesar da anemia de Fanconi ser uma doença genética rara, ao longo dos últimos 25 anos, a equipe do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFR) acumulou uma vasta experiência no transplante desta enfermidade, estando entre os principais centros do mundo. Dessa forma, torna-se extremamente importante a verticalização do conhecimento em pontos pouco estudados na literatura internacional, como a falha de pega do enxerto. Vários trabalhos citam suas experiências e incidências de falha primária e secundária de pega, entretanto os dados existentes do tema na AF são ainda mais escassos.

Esse estudo retrospectivo é o primeiro a analisar especificamente os fatores associados à falha primária, secundária e ocorrência de leucemia mielóide aguda em pacientes com AF, além de reportar suas evoluções. Com um seguimento de 252 meses, a SG dos pacientes com FPP foi de 13,3%, FSP ou evolução para LMA de 22,2% e 53,6% nos pacientes com pega medular sustentada.

Observou-se que a mortalidade relacionada ao procedimento nos primeiros 30 dias ainda é elevada em nosso centro, uma vez que 24 pacientes, 10% da amostra, faleceu nesse período. Acreditamos que esse fato seja devido à demora no encaminhamento dos pacientes com AF ao centro de referência. Apesar de 15 pacientes possuírem doadores aparentados, a mediana de idade no transplante foi de 11,5 anos (5-31), a duração de doença foi de 60 meses (2-159), haviam recebido uma mediana de 50 unidades de transfusões sanguíneas (2-259), além de neutropenia (mediana $493 \times 10^3 \text{u/L}$) e plaquetopenia (mediana $12 \times 10^3 \text{u/L}$) severas.

A ocorrência de LMA após o transplante foi um evento raro (1,41%) e não esteve associada à mielodisplasia ou alterações citogenéticas prévias. A evolução desses pacientes foi muito desfavorável, pois não foram resgatados com quimioterapia ou novo transplante, tendo 0% de sobrevida global.

Nossos resultados confirmam os dados existentes na literatura sobre as causas de óbito nos pacientes com FP, sendo as infecções bacterianas e fúngicas as principais responsáveis pelo evento final^{44,45}.

Os pacientes com FPP que receberam um segundo transplante com doadores diferentes apresentaram melhor evolução, uma vez que todos os pacientes transplantados com o mesmo doador evoluíram com FP novamente. Isso sugere que podem existir fatores intrínsecos do doador, ainda não conhecidos, na patogênese da FP. Outro dado observado nos casos com FPP foi o mau prognóstico dos pacientes transplantados com SCU, pois somente um paciente foi resgatado.

Apesar de todos os pacientes com FSP terem recebido transplantes com compatibilidade HLA completa e apenas um caso com doador NAP, a SG do grupo ainda foi baixa. Metade do grupo recebeu um segundo transplante com os mesmos doadores e apresentou pega medular adequada, os outros pacientes foram a óbito em decorrência de complicações da neutropenia prolongada.

Os resultados do presente estudo concordam com os encontrados na literatura, com uma incidência cumulativa de falha de pega mais elevada em pacientes com doadores NAP. A IC de FP foi de 7,63% aos 12 meses e 10,9% aos 24 meses em transplantes com doadores aparentados e 28,19% com doadores NAP. Em 1995, Eliane Gluckman e colaboradores reportaram dados

do IBMTR com 228 pacientes portadores de AF e encontraram uma probabilidade de FP em 2 anos de 8% para pacientes com doadores aparentados e 24% para NAP⁴⁴. Em 2000, Guardiola relatou uma probabilidade de FP de 19% em 1 ano em transplantes com doadores NAP⁴⁵.

Dentre os fatores de risco para a FP a sensibilização prévia, seja por transfusões ou gestações é de amplo conhecimento. Já em 1989, Champlin demonstrou uma maior FPP em pacientes com anemia aplástica severa poli transfundidos, especialmente com mais de 40 transfusões⁴⁹. No contexto da AF com doadores NAP, Guardiola demonstrou uma maior falha de pega secundária em pacientes com mais de 20 unidades de transfusões⁴⁵. O estudo atual encontrou que mais de 10 unidades de transfusões esteve associada a um maior risco para falha primária e secundária de pega. A possível explicação para um menor limite de corte do que o previamente relatado, pode ser a qualidade dos hemocomponentes transfundidos. Em nosso serviço todos os hemoderivados são filtrados, entretanto pacientes oriundos de outros centros podem ter recebido transfusões sem filtros, o que causaria uma maior sensibilização a antígenos.

Guardiola também encontrou que doadores do sexo feminino, pacientes com hemoglobina abaixo de 8g/dl no momento do transplante, com anormalidades físicas em membros e positividade para CMV apresentaram maior FSP na análise univariada. O único fator que permaneceu com significância na análise multivariada foi o valor de hemoglobina. Também em transplantes com doador NAP, Wagner e colaboradores relataram que a ausência de fludarabina no regime de condicionamento e a presença de mosaicismos celulares estavam associados à ocorrência de FP⁴⁶. Alguns autores

referiram que a presença de células DEB resistentes poderia estar associada à FP, entretanto nesse estudo de Wagner⁴⁶, a presença da fludarabina no regime de condicionamento, foi capaz de superar essa resistência. Em nosso estudo, o sexo do doador, valor de hemoglobina, positividade para CMV ou severidade da doença não estiveram relacionados à FP, entretanto encontramos que uma menor contagem de leucócitos totais ao diagnóstico foi um fator predisponente para FP secundária. Os dados de mosaïcismo celular não puderam ser avaliados no presente estudo.

Em transplantes de órgãos sólidos é bem conhecido o papel dos anticorpos anti- HLA como causadores da FP^{53,54} e recentemente passou-se a pesquisar essa variável nos TCTH⁵⁵⁻⁵⁹. Inicialmente a pesquisa da presença de anticorpos anti-HLA era feita por prova cruzada do soro do paciente contra linfócitos B ou T do doador e foi vista maior incidência de FP quando o teste era positivo. No estudo de Anasetti, a FP foi de 62% nos pacientes com o referido teste positivo e 7% nos negativos ($p < 0.001$)⁵⁵. Com técnicas mais apuradas, foi possível fazer a detecção de anticorpos anti-HLA (AA) e anticorpos anti-HLA específicos do doador (AED)⁵⁸. Ciurea e colaboradores encontraram uma maior incidência de FP em mulheres múltíparas, com mais de duas gestações, nas quais foram detectados elevados títulos de AED. Demonstraram ainda, que a presença de AED, mas não de AA aleatórios têm relação com FP⁵⁷. Spellman também demonstrou que a existência de elevados títulos de AED causaram uma incidência de FP de até quatro vezes maior do que os pacientes sem AA⁵⁸. Nos dois estudos citados anteriormente, houve uma maior frequência de anticorpos anti HLA-DP nos casos com FP e os autores sugerem que esse fator seja considerado na busca de doadores NAP.

Estudando TCTH com SCU, Takanaski mostrou uma pega neutrofílica e plaquetária mais tardia quando havia AED ou AA, do que nos pacientes com pesquisa de anticorpos negativa⁵⁹. No presente estudo, a pesquisa de AA foi realizada em apenas 49 pacientes (23,1% da amostra) e em 15 casos a pesquisa foi positiva. Apenas um paciente apresentou AED e evoluiu com FPP. Devido ao pequeno número de pacientes com a pesquisa de AA realizada, não se pôde chegar a uma conclusão quanto ao seu papel na FP. Não foram encontrados estudos na literatura sobre a pesquisa de AA e FP no contexto da AF.

Há mais de duas décadas, Anasetti et al mostraram que transplantes com incompatibilidades HLA têm uma maior chance de FP (12,3%), comparados com doadores totalmente compatíveis (2%). O número de incompatibilidades também é importante, com incidência de FP de 9% com uma incompatibilidade HLA e 21% com duas⁵⁵. Nossos resultados confirmaram esse achado, uma vez que transplantes com incompatibilidade HLA tiveram HR de 3,08 em favor da falha de pega. Disparidades HLA de classe II não parecerem interferir na pega do enxerto, entretanto a presença de mais de uma incompatibilidades em classe I, especialmente em C, estão relacionados à maior FP^{60,61}.

Em 1983, Storb relatou o baixo número de células nucleadas total (CNT) como sendo um importante fator para FP⁶². Atualmente, almeja-se uma contagem de CNT $\geq 2 \times 10^8$ /kg para MO e $\geq 3 \times 10^7$ /kg para SCU, a fim que se evitar a FP⁶³. Nesse estudo, as medianas de CNT e CD34 foram de $4,49 \times 10^8$ /kg e $2,02 \times 10^6$ /kg, respectivamente e não estiveram associadas à maior incidência de FP. Alguns autores sugerem que doadores do sexo

feminino tenham uma menor contagem de CNT coletadas, e que esse seja o causador de maior FP e não a sensibilização prévia por gestações^{45,66}.

Apesar da importante redução na DECH nos transplantes com depleção de células T, existe uma maior ocorrência de falha primária e secundária de pega⁴⁵. Além da redução significativa de células CD34 no enxerto depletado, há também diminuição de células CD3, células B, hematogôneas, monócitos e células dendríticas plasmocíticas. Alguns autores sugerem que a redução desse conjunto de células seria o responsável pela maior FP nos transplantes com depleção de células T⁶³.

A utilização de ciclosporina (CSA) na imunoprofilaxia reduz a ocorrência de FP quando comparado ao metotrexato isoladamente⁵¹ e como a CSA foi utilizada na totalidade dos pacientes deste estudo, este fator não pôde ser avaliado.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que na população avaliada, a falha de pega esteve associada à idade ao transplante, uso de doadores NAP ou com incompatibilidades HLA, ausência de fludarabina no condicionamento, uso prévio de andrógenos e mais do que 10 unidades de transfusões antes do transplante.

A falha primária de pega foi influenciada pelo número de transfusões previamente ao transplante e a utilização de doadores não aparentados. O maior número de transfusões sanguíneas também esteve associado à falha secundária de pega.

O ano da realização do transplante, sexo do doador, status de CMV e severidade da doença não estiveram associados à falha de pega.

A incidência cumulativa de falha de pega na amostra estudada foi de 18,9%, sendo mais elevada nos transplantes com doadores não aparentados (36,2%) e quando sangue de cordão umbilical foi utilizado (40%).

A sobrevida global foi de 13,3% nos pacientes com falha primária de pega e alguns pacientes apresentaram pega medular após a realização de um novo transplante com doadores diferentes. Os pacientes com falha secundária de pega ou evolução para leucemia tiveram sobrevida global de 22,2% e parte dos pacientes pôde ser resgatada com um novo procedimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fanconi G. Familiäre infantile perniziösaartige Anaämie (perniziöses Blutbild and Konstitution). Jahrbuch Kinder. 1927;117:257-260.
2. Fanconi G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (FA). I. Clinical aspects. Semin Hematol. 1967;4:233-240.
3. Schroeder TM, Anschutz F, Knopp A. Spontane chromosome aberrationen bei familiaerer Panmyelopathie. Humagenetik. 1964;1:194-196.
4. Auerbach AD, Adler B, Chaganti RS. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. Pediatrics. 1981;67:128-135.
5. Gluckman E, Devergie A, Schaison G, et al. Bone Marrow Transplantation in Fanconi anaemia. Br J Haematol. 1980; 45: 557-64.
6. Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H. Fanconi anemia. In: Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol 1. 8th ed. New York:McGraw-Hill;2001:753-68.
7. Alter B, Young N. The bone marrow failure syndromes In: Nathan DG. In: Orkin SH, editors. Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia, PA: W.B. Saunders;1998.
8. Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. Am J Med Genet A. 2011;155A(8):1877-83.
9. Ruppitsch W, Meisslitzer C, Weirich-Schwaiger H, et al. The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia. Hum Genet. 1997;99:710-719.

10. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nat Rev Genet.* 2001;2:446-57.
11. Soulier J. Fanconi Anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011:492-97.
12. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet.* 2007; 8: 735-48.
13. Young NS, Alter BP. Clinical features of Fanconi's anemia. In: Young NS, Alter BP, eds. *Aplastic Anemia Acquired and Inherited.* Philadelphia, PA: Saunders; 1994:275-309.
14. Kutler DL, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood.* 2001;101:1249-1256.
15. Auerbach AD; Allen R.G. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet Cytogenet.* 1991;51:1-12.
16. Rosenberg P.S, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood,* 2003;101:822-826.
17. D'Andrea A.D; Grompe M. Molecular Biology of Fanconi Anemia: Implications for Diagnosis and Therapy. *Blood.* 1997; 90:1725-1736.
18. Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood.* 2006;107:4223-33.
19. Wagner JE, Tolar J, Levrn O, et al. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood.* 2004;103:3226-29.

20. Alter BP. Diagnosis, Genetics, and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007: 29-38.
21. Auerbach AD; Rogatko A; Schroeder-Kurth T M. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxubutane sensitivity. Blood. 1989;73:391-96.
22. Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. Exp Hematol. 1993;21:731-33.
23. Shimamura A, Oca RM, Svenson JL, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. Blood. 2002;100:4649-54.
24. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, et al. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. Blood. 2005;105:1329-36.
25. Pulsipher M, Kupfer GM, Sulliman A, et al. Subtyping analysis of Fanconi anemia by immunoblotting and retroviral gene transfer. Molecular Medicine. 1998;4:468-79.
26. Pilonetto DV, Pereira NI, Bitencourt MA, et al. FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia. Braz J Med Biol Res. 2009;42:237-43.
27. Magdalena N, Pilonetto DV, Bitencourt MA, et al. Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the FANCA 3788-3790 del mutation. Braz J Med Biol Res. 2005;38:669-73.
28. Gregory JJ, Wagner JE, Verlander PC, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in

- lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2532-37.
29. Wagner JE, et al. Hematopoietic cell transplantation for Fanconi anemia. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, editors. *Thomas Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2003 p.1483-1506.
30. Pasquini R. Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas para as Anemias Aplásticas Adquiridas e Constitucionais. *Transplante de Células- Tronco Hematopoiéticas*. Editor: Júlio C. Voltarelli. Atheneu, São Paulo. 2009:233-257.
31. Gluckman E, Devergie A, Dutreix J. Radiosensitivity in Fanconi anemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. 1983;54:431-440.
32. Berger R, Bernheim A, Gluckman E et al. In vivo effect of cyclophosphamide metabolites on chromosomes of Fanconi anemia patients. *Br J Haematol*. 1980;45:565-571.
33. Gluckman E, Devergie A, Dutreix J. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Semin Haematol*. 1984;21:20-26.
34. Deeg HJ, Socie G, Schoch G, et al. Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. *Blood*. 1996; 87:386-392.
35. Socie G, Devergie A, Girinski T, et al. Transplantation for Fanconi's anemia: long term follow-up of fifty patients transplanted from a sibling donor after low-dose cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning. *Br J Haematol*. 1998;103:249-255.

36. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and deaths in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood*. 2003;105:67-73.
37. Guardiola P, Socie G, Li X, et al. Acute graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia or acquired aplastic anemia undergoing bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors: risk factors and influence on outcome. *Blood*. 2004;103:73-77.
38. Flowers M, Zanis J, Pasquini R, et al. Marrow transplantation for Fanconi Anemia: conditioning with reduced doses of cyclophosphamide without radiation. *Br J Haematol*. 1996;92:699-706.
39. Gluckman E, Rocha V, Ionescu I, et al. Results of unrelated cord blood transplant in Fanconi Anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:1073-1082.
40. Zanis J, Bitencourt MA, Medeiros CR, et al. Bone marrow transplantation for patients with Fanconi anemia: a study of 24 cases from a single institution. *Bone Marrow Transplantation*. 1995;15:293-298.
41. Medeiros CR, Zanis JN, Pasquini R. Bone marrow transplantation for patients with Fanconi anemia: reduced doses of cyclophosphamide without irradiation as conditioning. *Bone Marrow Transplantation*. 1999;24:849-852.
42. Bonfim CM, De Medeiros CR, Bitencourt MA, et al. HLA-matched related donor hematopoietic cell transplantation in 43 patients with Fanconi anemia conditioned with 60 mg/kg of cyclophosphamide. *Biol BMT*. 2007;13:1455-1460.

43. Pasquini R, Carreras J, Pasquini M, et al. HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia: comparison of irradiation and nonirradiation containing conditioning regimens. *Biol BMT*. 2008;14:1141-1147.
44. Gluckman E, Auerbach AD, Sobocinski KA, et al. Bone marrow transplantation in Fanconi anemia. *Blood*. 1995;86:2856-2862.
45. Guardiola P, Pasquini R, Dokal L, et al. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2000;95:422-429.
46. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood*. 2007;19:2256-2262
47. Wolff SN. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *BMT*. 2002;29:545-552.
48. Chan KW, Grimley MS, Taylor C, Wall DA. Early identification and management of graft failure after unrelated cord blood transplantation. *BMT*. 2008;42:35-41.
49. Champlin RE, Horowitz MM, Bekkum WV, et al. Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: risk factors and treatment results. *Blood*. 1989;73:606-613.
50. Martin PJ. Overview of Hematopoietic Cell Transplantation Immunology. In: Thomas' Stem Cell Transplantation. Ed Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR. Blackwell Publishing, Massachusetts. 2004:16-30.

51. Voltarelli J, Malmegrim KCR, Diamond HR, Almeida-Oliveira AA, Rodrigues MC, Ferreira E. Imunologia no Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas. In Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas. Ed Voltarelli J, Pasquini R, Ortega ETT. Atheneu, São Paulo. 2009:57-92
52. Zanis Neto J, Calixto RF, Ostronoff M. Citopenias Hematológicas e Falha de Enxertia Pós Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas. In Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas. Ed Voltarelli J, Pasquini R, Ortega ETT. Atheneu, São Paulo. 2009:631-651.
53. Patel R, Terasaki PI. Significance of positive crossmatch in kidney transplantation. N Engl J Med. 1969;280:735-739.
54. Held PJ, Kahan BD, Hunsicker LG. The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants. N Engl J Med. 1994;331:765-770.
55. Anasetti C, Amos D, Beatty PG, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. N Engl J Med. 1989;320:197-204.
56. Taylor PA, Ehrhart MJ, Roforth MM, et al. Preformed antibody, not primed T cells, is the initial and major barrier to bone marrow engraftment in allosensitized recipients. Blood. 2007;109:1307-1315.
57. Ciurea SO, Thall PF, Wang X, et al. Donor-specific anti-HLA Abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2001;118:5957-5964
58. Spellman S, Bray R, Rosen-Bronson, et al. The detection of donor-directed HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated

- hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure. *Blood*. 2010;115:2701-2708.
59. Takanashi M, Atsuta A, Fujiwara K, et al. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantation. *Blood*. 2010;116:2839-2846.
60. Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, et al. Association of HLA-C Disparity With Graft Failure After Marrow Transplantation from Unrelated Donors. *Blood*. 1997;89:1818-1823.
61. Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C. Optimizing Outcome After Unrelated Marrow Transplantation by Comprehensive Matching of HLA Class I and II Alleles in the Donor and Recipient. *Blood*. 1998;92:3515-3520.
62. Storb R, Prentice RL, Thomas ED, et al. Factors associated with graft failure after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia. *Br J Haematol*. 1983;55:573-577.
63. Larghero J, Garcia J, Gluckman E. Sources and procurement of stem cells. In: *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*. Eds Apperley J, Carreras E, Fugier-Viver IJ, Rezzoug F, Huang Y. Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J Exp Med*. 2005;201:373-383.
64. Favre G, Beksac M, Bacigalupo A, et al. Differences between graft product and donor side effects following bone marrow or stem cell donation. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMTR). *Bone Marrow Transplantation*. 2003;32:873-80

65. Hows J, Palmer S, Gordon-Smith EC. Cyclosporine A and graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Br J Haematol.* 1985;60:611-616.
66. MacMillan ML, Wagner JE. Hematopoietic cell transplantation for congenital bone marrow failure. *Curr Opin Oncol.* 2005;17:106-113.