

LARISSA ALESSANDRA MEDEIROS

**TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR COM CICLOSPORINA E PREDNISONA NA
ANEMIA APLÁSTICA: SEGUIMENTO DE 20 ANOS E ESTUDO DOS FATORES
PREDITORES DE RESPOSTA NUM CENTRO DE REFERÊNCIA BRASILEIRO.**

CURITIBA

2011

LARISSA ALESSANDRA MEDEIROS

**TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR COM CICLOSPORINA E PREDNISONA NA
ANEMIA APLÁSTICA: SEGUIMENTO DE 20 ANOS E ESTUDO DOS FATORES
PREDITORES DE RESPOSTA NUM CENTRO DE REFERÊNCIA BRASILEIRO.**

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 Ricardo Pasquini

CURITIBA

2011

Medeiros, Larissa Alessandra

Tratamento imunossupressor com ciclosporina e prednisona na anemia aplástica: seguimento de 20 anos e estudo dos fatores preditores de resposta num centro de referência brasileiro / Larissa Alessandra Medeiros. -- Curitiba- PR, Universidade Federal do Paraná, 2011.

xi, 33 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr Ricardo Pasquini

Dissertação (mestrado) – UFPR / Ciências Médicas / Hematologia, 2011.

Referências bibliográficas: f. 28-33

1. Anemia Aplástica. 2. Tratamento Imunossupressor. 3. Ciclosporina. 4. Prednisona. 5. Sobrevida global. 6. Citogenética. 7. HLA-DR15. 8. Clone HPN - Tese. I. Pasquini, Ricardo. II. Medeiros, Larissa Alessandra. III. Universidade Federal do Paraná, Faculdade de Medicina - Mestrado em Ciências Médicas, IV. Título.

Dedico este trabalho a meus pais Maria Helena e Jonas, por saberem aliar amor, ética e educação de forma tão harmônica.

Dedico também as minhas queridas irmãs, Patrícia e Bruna, pela doce amizade e companheirismo nos mais diversos momentos da vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por nortear meus caminhos.

Agradeço imensamente ao Professor Dr Ricardo Pasquini, pelos ensinamentos e rigor científico. Sua dedicação à Hematologia e ao Transplante de Medula Óssea fez deste serviço uma referência nacional, respeitado por outros centros no mundo.

Ao amigo Dr Samir Kanaan Nabhan pelo imenso auxílio estatístico.

Ao laboratório de Imunogenética, especialmente Dras Noemi Farah Pereira e Cleusa Schafhauser, pela gentileza em ajudar nos dados de histocompatibilidade.

Agradecimentos também ao laboratório de Imunofenotipagem, principalmente às Dras Mariester Malvezzi e Ana Paula Azambuja, e todo o grupo do laboratório de Citogenética.

Aos criadores do Ambulatório de Falência Medular e aos colegas que seguem no serviço: Drs Marco Antonio Bitencourt, Carlos R de Medeiros, Jefferson Ruiz e Michel Michels de Oliveira.

A todos os médicos, equipes de enfermagem e multidisciplinar do serviço de transplante de medula óssea pelo apoio e auxílio, em especial Caroline B. S Sola, Daniela C. Setúbal, Noemi F. Pereira, Rebeca T. Gomes e Vaneuza A. M. Funke pela amizade incondicional.

Aos pacientes, por serem motivação e propósito do nosso trabalho.

RESUMO

O tratamento imunossupressor é a melhor alternativa para aqueles pacientes com Anemia aplástica (AA) sem doadores aparentados compatíveis ou com idade > 40 anos. Desde 1988, pela irregularidade de distribuição da globulina anti-timocítica (ATG) em nosso meio, foi implementado um protocolo alternativo com ciclosporina (CSA) e prednisona (PRD). Este estudo visa mostrar os resultados deste tratamento, quanto à qualidade da resposta, sobrevida global e possíveis fatores preditores de resposta ao tratamento imunossupressor.

Trezentos e oitenta e quatro pacientes com diagnóstico de AA foram avaliáveis através de registro em prontuário médico, no período de 12/1988 a 12/2008. As avaliações de resposta foram realizadas com 3, 6, 12 meses e então anualmente. A sobrevida global foi de 61% (± 3), com mediana de seguimento de 7 anos (2 meses – 23 anos). Resposta ao tratamento: 51% tiveram algum grau de resposta, com vida normal e independente de transfusões (143 pacientes com resposta completa e 53 com resposta parcial). 36 pacientes não obtiveram resposta e 152 restantes incluem 96 óbitos e perda de seguimento. A maioria dos pacientes respondeu entre 3 e 6 meses do tratamento. Na análise multivariada o número de neutrófilos $\geq 200/\mu\text{L}$ ($p=0,009$), plaquetas $\geq 12.000/\mu\text{L}$ ($p=0,018$), reticulócitos $\geq 0,5\%$ ($p<0,001$) e início do tratamento após o ano de 1997 ($p=0,002$) apresentaram impacto na sobrevida global. Já os pacientes com 15 ou mais transfusões ($p=0,006$) e idade ≥ 40 anos ($p=0,003$) tiveram sobrevida inferior quando comparados. De acordo com a severidade, a sobrevida global no subgrupo com a forma severa foi 63% (± 4) e 42% (± 6) nas formas muito severas ($p<0,001$). A incidência cumulativa de recaída foi de 28% (± 4) com mediana de 4,4 anos e possibilidade de recuperação com novo protocolo imunossupressor. A taxa de evolução clonal foi de 7,81% (16 pacientes com HPN, 9 com mielodisplasia e 5 casos de leucemia mieloide aguda). Menos de 10% tinham clone HPN ao diagnóstico, com 36,6% dos pacientes apresentando HLA-DR15 (versus 20% população normal). Não houve correlação com resposta ou sobrevida com as alterações citogenéticas ao diagnóstico, a presença de clone HPN ou a presença de HLA-DR15. Este estudo demonstra que a sobrevida global utilizando CSA e prednisona é similar sem o uso de ATG, com período longo de seguimento. A sobrevida foi influenciada pela contagem de neutrófilos, plaquetas, reticulócitos, bem como número de transfusões e idade do paciente ao diagnóstico, além do ano de início do tratamento.

Palavras-chave: anemia aplástica, tratamento imunossupressor, ciclosporina, prednisona, sobrevida global, citogenética, HLA-DR15, clone HPN.

ABSTRACT

Immunosuppressive therapy is the best alternative for patients with aplastic anemia (AA) without matched sibling donor or with age > 40 years. Since 1988, an alternative protocol was developed with cyclosporine (CSA) and prednisone (PRD) due to irregularity in distribution of anti-thymocyte globulin (ATG) in Brazil. This study aims to show the results of this treatment on the quality of response, overall survival and possible predictors of response to immunosuppressive treatment. 384 patients diagnosed with AA were evaluable by medical records review from 12/1988 to 12/2008. Treatment evaluation was performed at 6 weeks, 3, 6 and 12 months and then yearly. Overall survival was 61% (± 3) with a median follow-up of 7 years (2 months - 23 years). Response to treatment: 51% had some degree of response, with good quality of life and transfusions independent (143 patients with complete response and 53 partial response). 36 patients had no response and there were 96 deaths. Fifty six patients have lost follow-up. Most of the patients achieved response between 3 and 6 months of therapy. In multivariate analysis the number of neutrophils $\geq 200/\mu\text{L}$ ($p = 0.009$), platelets $\geq 12.000/\mu\text{L}$ ($p = 0.018$), reticulocyte $\geq 0.5\%$ ($p < 0.001$) and starting treatment after the year 1997 ($p = 0.002$) had an impact on overall survival. Patients with 15 or more previous transfusions ($p = 0.006$) and age ≥ 40 years ($p = 0.003$) had lower survival. Overall survival for patients with severe disease was 63% (± 4) and 42% (± 6) for patients with very severe aplastic anemia ($p < 0.001$). Cumulative incidence of relapse was 28% (± 4) within a median of 4.4 years. Hypertension, gingival hypertrophy and diabetes mellitus were common, but easily controlled. The rate of clonal evolution among this cohort was 7.81% (16 patients developed PNH, 9 MDS and 5 acute myeloid leukemia). Less than 10% had PNH clone at diagnosis, with 36.6% of patients having HLA-DR15 (20% versus normal population). There was no correlation with response or survival with cytogenetic abnormalities at diagnosis, the presence of PNH clone or the presence of HLA-DR15.

This study, with a long follow-up, has demonstrated that the overall survival using CSA and PRD is similar to that reported with ATG therapy. Survival was influenced by the ANC, platelet counts, reticulocyte, number of transfusions, age at diagnosis, and therapy started after 1997. The incidence of clonal evolution was lower when compared to reported trials with ATG + CSA.

Key words: Aplastic anemia, immunosuppressive treatment, cyclosporine, prednisone, overall survival, cytogenetic, HLA-DR15, PNH clone.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Critérios de Resposta ao Tratamento Imunossupressor.....11

TABELA 2 – Características de 384 pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD no período de dez/1988 a dez/2008.....13

TABELA 3 – Achados Citogenéticos ao diagnóstico dos pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD.....15

TABELA 4 - Distribuição das Causas de Óbitos entre os pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD.....18

TABELA 5 - Análise Multivariada dos pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD.....19

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Distribuição por faixa etária de 384 pacientes com Anemia aplástica submetidos a tratamento com CSA e PRD.....	14
FIGURA 2A - Sobrevida global da população de 384 pacientes com Anemia Aplástica (AA) tratados com CSA e PRD.....	17
FIG 2B - Sobrevida global de acordo com a severidade da doença.....	17
FIG 2C - Sobrevida global relacionada a resposta após 2 anos de tratamento.....	17
FIG 2D - Sobrevida global dos pacientes com AA < 10 anos de idade.....	17
FIGURA 3 - Incidência Cumulativa de Recaída nos pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD.....	20
FIGURA 4 – Incidência Cumulativa de Evolução Clonal nos pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD.....	20

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

AA – anemia aplástica
AAS – anemia aplástica severa
AF – anemia de Fanconi
ATG - globulina anti-timocítica
DEB teste – diepoxibutano teste
CSA – ciclosporina
CEP – Comitê de ética e pesquisa em seres humanos
EBMT – European Bone Marrow Transplantation
GAL – globulina anti-linfocítica
G-CSF – fator estimulante de colônia de granulócitos
HC-UFPR – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HLA – antígeno leucocitário humano
HPN – hemoglobinúria paroxística noturna
IL- 1 – interleucina 1
ISS – imunossupressão
LMA – leucemia mielóide aguda
MDS – mielodisplasia
NIH - National Institute Health
PCR-SSP - Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers
PCR-SSO - Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide
PRD – prednisone
RC / RP – resposta completa / resposta parcial
SPSS - Statistical Package for Social Sciences
SR – sem resposta
TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido
TMO- transplante de medula óssea
TNF – fator de necrose tumoral
♂ / ♀ - sexo masculino / feminino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Aspectos Gerais da Anemia Aplástica.....	01
1.2 Tratamento da Anemia Aplástica Adquirida.....	03
1.3 Preditores de Resposta ao Tratamento Imunossupressor.....	04
1.4 Protocolo Brasileiro: Ciclosporina e Prednisona.....	06
2 OBJETIVOS.....	08
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	09
3.1 Casuística.....	09
3.2 Metodologia	09
3.3 Análise estatística.....	12
4 RESULTADOS.....	13
5 DISCUSSÃO.....	21
6 CONCLUSÕES.....	27
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
APÊNDICE.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA ANEMIA APLÁSTICA

A Anemia aplástica (AA) é uma entidade rara e heterogênea, caracterizada por pancitopenia em sangue periférico associada à medula óssea hipocelular e sem evidência de infiltração neoplásica, mieloproliferativa ou fibrose. A incidência é variável de 1,5 a 6 casos/10⁶ habitantes/ano conforme o país de origem; há maior prevalência no Sudeste Asiático associado à exposição exacerbada de toxinas e vírus¹⁻⁴. Na América Latina observou-se a ocorrência de 1,6 casos/10⁶ habitantes/ano, enquanto no Brasil com base populacional no estado do Paraná, apresenta o índice de 2,1^{4,5}. Não há significativa diferença entre os sexos, com distribuição bifásica de faixa etária, com picos entre 15 a 25 anos e acima de 60 anos de idade^{1,2}.

A etiologia é considerada idiopática em 70 a 80% dos casos. Sabe-se através de estudos epidemiológicos que exposição a drogas, agentes químicos, radiação, agentes virais, doenças imunes, gestação, além de outros, estão correlacionados ao desenvolvimento da aplasia medular no restante dos casos^{1,4}.

A anemia aplástica ainda pode ser classificada como adquirida ou constitucional, esta última associada a doenças genéticas sendo a anemia de Fanconi a mais freqüente, além da disceratose congênita e outras^{1,2,3,6}. A AA adquirida por ter critérios diagnósticos bem definidos e ser mais homogênea em patogenia, história natural e tratamento, compõe a população do estudo retrospectivo deste trabalho.

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da AA adquirida não são totalmente conhecidos, com três possíveis hipóteses: lesão intrínseca da célula progenitora hematopoiética, participação imune no desencadeamento e manutenção das citopenias, além de possíveis alterações do micro-ambiente da medula óssea. Estudos recentes, como as mutações no gene da telomerase, são apenas um exemplo que fatores mais complexos estão envolvidos no gatilho da falência medular, na recaída e na evolução clonal após o tratamento imunossupressor em alguns pacientes. O NIH (National Institutes of Health), com vasta experiência em anemia aplástica, reportou em estudo que 1/3 dos pacientes com a forma adquirida tinham telômeros curtos, mas somente 10% com mutações detectadas^{2,6,7}.

O prognóstico e o plano terapêutico na AA baseiam-se na intensidade das citopenias e por isso foi proposto graus de gravidade que incluem a forma moderada (não severa), severa e muito severa. A forma severa precisa de pelo menos dois destes achados em sangue periférico: neutrófilos abaixo de $500/\mu\text{L}$, contagem de plaquetas inferior a $20.000/\mu\text{L}$ e contagem de reticulócitos corrigida menor que 1% na presença de anemia, sempre associado à celularidade de medula óssea inferior a 30% (moderadamente hipocelular) ou 20% (intensamente hipocelular) (Camitta et al 1975). Já a forma muito severa é aquela que apresenta neutrófilos abaixo de $200/\mu\text{L}$ (Bacigalupo et al 1988), enquanto a forma moderada inclui as restantes^{8,9}.

1.2 TRATAMENTO DA ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA

A anemia aplástica, especialmente na forma severa e muito severa, apresenta-se como uma urgência hematológica atingindo mais de 80% de mortalidade se não tratada de forma rápida e eficaz. Além do suporte clínico e hemoterápico, o objetivo maior do tratamento é a restauração da hematopoiese, principalmente com o transplante de medula óssea alogênico e a terapia imunossupressora.

O transplante de medula óssea é o tratamento de escolha para os pacientes com anemia aplástica severa, habitualmente < 40 anos e que possuem doador aparentado histocompatível. Nos pacientes pouco transfundidos (< 15 transfusões), as curvas de sobrevida ficam acima de 90% e chegam a valores de 60-80% nos demais pacientes, inclusive naqueles com doadores não aparentados^{1,10-13}.

Em contrapartida, o tratamento imunossupressor é a melhor alternativa para aqueles sem doador HLA idêntico, com idade mais avançada (≥ 40 anos) e pacientes com a forma não-severa que são dependentes de transfusão ou neutropenia de risco (Guideline EBMT 2009, Marsh et al)¹⁻³. A combinação recomendada (standard) para imunossupressão consiste em ciclosporina (CSA) e globulina anti-timocítica (ATG) ou linfocítica (GAL) de coelho ou cavalo, com resultados de sobrevida e taxas de resposta entre 60 e 80%^{1-3,10-18}. Antes da terapia imunossupressora, as opções excluindo o transplante eram apenas o uso de andrógenos e suporte transfusional, com resultados de sobrevida próximos a 20% em 10 anos^{18,19}.

Outros tratamentos imunossupressores, com uso de ciclofosfamida (Tisdale et al, Blood 2002), CSA associada a ATG e fator estimulante de colônias (G-CSF) (Gluckman et al, BrJH 2002), daclizumab (Maciejewski et al, Blood 2003), CSA em conjunto com ATG e micofenolato (Scheinberg et al, BrJH 2006), CSA e ATG associados a sirolimus (Scheinberg et al, Haematologica 2009), alentuzumab + CSA (Risitano et al, EBMT, BrJH 2009) não atingiram taxas de resposta superiores a ponto de se tornarem 1ª linha por necessitarem mais estudos clínicos em grupos selecionados de pacientes^{1,12-17}.

A alta taxa de recaída (20-45%) e a ocorrência de evolução clonal que pode atingir até 20% dos pacientes merecem destaque no tratamento imunossupressor. A reintrodução da imunossupressão é capaz de induzir a resposta hematológica parcial e completa em 20- 30% dos casos; os cuidados na retirada da CSA de forma lenta e gradual ou manutenção permanente de baixa dose privilegiam uma porcentagem de pacientes (10%-15%) que se tornam dependentes de CSA^{1,15,20,22}.

A evolução clonal da AA para outras doenças hematológicas tem sido reportada como um efeito tardio importante. Pode manifestar-se sob a forma de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) em 10-15%, e aproximadamente 8% para mielodisplasia (MDS)/leucemia mielóide aguda (LMA) em até 20 anos de seguimento (Frickhofen et al, 2003)^{1,2,8,15,19-22}.

1.3 PREDITORES DE RESPOSTA AO TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR

A existência de um mecanismo imune na patogenia da AA justificou o tratamento imunossupressor, porém não havia fatores conhecidos que

pu dessem pre dizer quais pacientes iriam obter resposta com o tratamento. Vários estudos fizeram questionamentos a cerca de possíveis características clínicas ou laboratoriais presentes ao diagnóstico que pu dessem estar associados com melhor resposta à imunossupressão, e consequentemente melhor sobrevida. Alguns trabalhos demonstraram que valores hematimétricos pré-tratamento, alterações no exame citogenético, imunofenotipagem de sangue periférico com clones HPN e a tipagem HLA (antígeno leucocitário humano) DR-15 podiam estar correlacionados com melhor resposta nos protocolos com ATG e CSA, embora os resultados ainda não sejam homogêneos²³⁻³⁵.

Scheinberg et al demonstrou como a contagem absoluta de linfócitos e reticulócitos em valores específicos pré-tratamento com CSA e ATG (cavalo) foi associado com melhor resposta e traduzida com aumento da sobrevida³⁴.

Em pequenas séries, parece não haver diferença na resposta entre pacientes com citogenética normal e anormal, mas há relatos de melhor resposta à imunossupressão na trissomia do cromossoma 8, com pior prognóstico e maior risco de transformação leucêmica na monossomia do 7^{1,23-28}. O aparecimento de citogenética anormal pode estar presente em 12% no diagnóstico de AA (Appelbaum et al, 1989; Tichelli et al, 1996; Gupta et al, 2006), embora a dificuldade da obtenção de metáfases numa medula óssea hipocelular possa chegar a 50% em algumas séries (metáfases ausentes ou crescimento insuficiente). As publicações apresentam variações, mas as anormalidades mais freqüentes são a trissomia do cromossomo 8 (t 8), trissomia do 6 (t 6) e relacionadas aos cromossomos 7 e 13.

Pacientes com AA portadores de clones HPN foram mais responsivos à imunossupressão em alguns estudos específicos, não confirmado em outros^{1,33-35}. Clones HPN podem estar presente em 30-50% dos pacientes com AA ao diagnóstico. A população do Brasil não teve esta variável estudada.

A AA tem uma incidência maior de HLA de classe II DR-15 comparados à população normal. Alguns centros publicaram uma possível correlação positiva com a resposta ao tratamento imunossupressor não confirmado por outras séries, como descrito para mielodisplasia; essa possível associação do HLA-DR15 também não está avaliado na população brasileira^{1,29,32-35}.

1.4 PROTOCOLO BRASILEIRO: CICLOSPORINA E PREDNISONA

Com base na revisão bibliográfica, o aspecto imune na fisiopatologia é o racional para o tratamento imunossupressor². Porém, desde 1988, devido ao suprimento irregular da globulina anti-timocítica (ATG) em nosso meio, foi optado por um ensaio clínico com CSA e prednisona. Comparado com experiências prévias, a CSA foi utilizada em dose maior e por tempo mais prolongado que no protocolo CSA + ATG (12,5 mg/kg reduzindo para 7mg/kg durante 1 ano *versus* 5 mg/kg por 6 meses respectivamente), associada ao potencial imunodepressor da prednisona. Os corticoesteróides como a prednisona, inibem a liberação de citocinas dos macrófagos como a IL-1 e TNF- α e a expressão dos seus respectivos receptores. Também se ligam aos receptores de citocinas nos linfócitos, inibindo tanto a liberação de IL-2 pelas

células T, como a estimulação das células T pela IL-2. Em doses altas mostram ainda atividade linfocitotóxica, que poderia atenuar a falta do ATG.

Este protocolo alternativo demonstrou resultados similares ao protocolo padrão com ATG ³⁶. Após 20 anos de seguimento, a necessidade de observar características gerais dessa população, como resposta clínica e sobrevida global, além de possíveis fatores preditores de resposta comparados à literatura motivaram essa análise retrospectiva.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal é a avaliação de resposta ao tratamento imunossupressor com ciclosporina (CSA) e prednisona (PRD) e a sobrevida global dos pacientes com anemia aplástica.

Os objetivos secundários são evidenciar as taxas de recaída e evolução clonal, observando possíveis fatores preditores de resposta ao tratamento imunossupressor ou melhor sobrevida global.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Entre o período de 12/1988 a 12/2008, 540 pacientes foram encaminhados para realizar tratamento imunossupressor. 384 pacientes foram elegíveis para análise (jovens sem doador HLA compatível, formas não severas com necessidade transfusional ou neutropenia de risco e pacientes >40 anos). Todos apresentavam critérios para anemia aplástica^{1,4} e foram avaliáveis através de registro em prontuário médico, com criação de banco de dados próprio, até último contato em dezembro de 2008.

Foram utilizados como critérios de exclusão: prontuário médico com dados incompletos, disfunção renal (creatinina $\geq 1,8$) com proscrição ao uso de ciclosporina (CSA), medula óssea com características displásicas, pacientes com doença maligna associada e DEB (diepoxibutano) teste + para Anemia de Fanconi.

3.2 METODOLOGIA

O tratamento imunossupressor consistiu em:

- ciclosporina (CSA) 12 mg/kg/dia ($\div 12/12$ horas) do dia 1 ao 8, com redução para 7 mg/kg/dia a partir do dia 9 até 1 ano, seguido de redução gradual (5% ao mês, até suspensão completa). Monitoração pelo nível sanguíneo (200 - 400 ng/dl);
- prednisona: 2 mg/kg/dia do dia 1 ao 14, após 1 mg/kg/dia do dia 15 ao 45. (com retirada de 20% dose por semana até suspensão).

Sulfametoxazol-trimetoprim e fluconazol foram utilizados para profilaxia contra *Pneumocystis carinii* (*P. jirovesi*) e doenças fúngicas, respectivamente.

No diagnóstico, o estudo citogenético foi realizado após cultura de medula óssea sem mitógenos por 24 -48 horas, com preparação das metáfases através de banda G (análise mínima válida ≥ 20 metáfases). O aprimoramento técnico do laboratório HC - UFPR (Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná) ocorreu a partir do ano 2000, resultando em maior eficiência em conseguir um número apropriado de metáfases em um número maior de pacientes. Anormalidade citogenética clonal foi definida como presença de 2 ou mais células tendo a mesma alteração estrutural ou cromossomo extra, ou 3 ou mais células com a mesma perda cromossômica. Não foram realizadas avaliações citogenéticas sistemáticas no decorrer do tratamento.

A metodologia na realização do HLA incluiu a linfotoxicidade dependente de complemento (permite identificar as especificidades sorológicas), com métodos moleculares através do PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers) e a PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide). Os pacientes acima de 40 anos, não eram tipados para HLA, por não terem indicação de transplante em 1ª linha¹. A incidência do HLA-DR 15 nos pacientes com AA foi comparada com um grupo controle de 637 doadores saudáveis de medula óssea (excluídos doadores de familiares com anemia aplástica), obedecendo a mesma distribuição racial e geográfica da população do estudo.

A pesquisa de clones HPN por citometria de fluxo iniciou em 2000. Pacientes com clones > 1% foram identificados para análise após esse período.

A resposta ao tratamento foi definida conforme tabela 1. As avaliações foram realizadas com 3, 6, 12 meses e então anualmente. A incidência de alterações citogenéticas clonais ao diagnóstico, presença do HLA-DR 15 e clones HPN, efeitos adversos do tratamento, ocorrência da evolução clonal ou recaída foram reportados e analisados.

Dependência de ciclosporina definiu-se por queda dos valores hematimétricos durante retirada ou parada abrupta desta medicação, com recuperação na restituição do uso da droga^{1,15,22}.

O registro retrospectivo 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 (TCLE) por se tratar de estudo retrospectivo, embora assegurado que o caráter anônimo dos pacientes será mantido e que suas identidades serão protegidas.

Tabela 1. Critérios de Resposta ao Tratamento Imunossupressor

Tipo de resposta	Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (/uL)	Plaquetas (/uL)
Completa	>10	> 1000	> 100.000
Parcial	>8	> 500	> 30.000
Sem resposta	Mantém necessidade transfusional	-	Mantém necessidade transfusional

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 15.0 para Windows.

Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise descritiva dos dados foram empregadas freqüências, porcentagens, médias, medianas e desvios padrão.

Utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes e o teste do Chi-quadrado com objetivo de comparação de pacientes. Aqueles que foram significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) na análise univariada, foram analisados na multivariada, através da regressão logística de Cox para verificar sua associação independente. A estimativa de sobrevida foi através do método de Kaplan-Meier; Hazard ratios e intervalos de confiança computados tiveram seus valores reportados.

4 RESULTADOS

Na tabela 2, estão as características dos 384 pacientes submetidos ao regime de imunossupressão com ciclosporina (CSA) e prednisona (PRD) acompanhados por 20 anos.

Tabela 2. Características de 384 pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD no período de dez/1988 a dez/2008 (HC- UFPR)*.

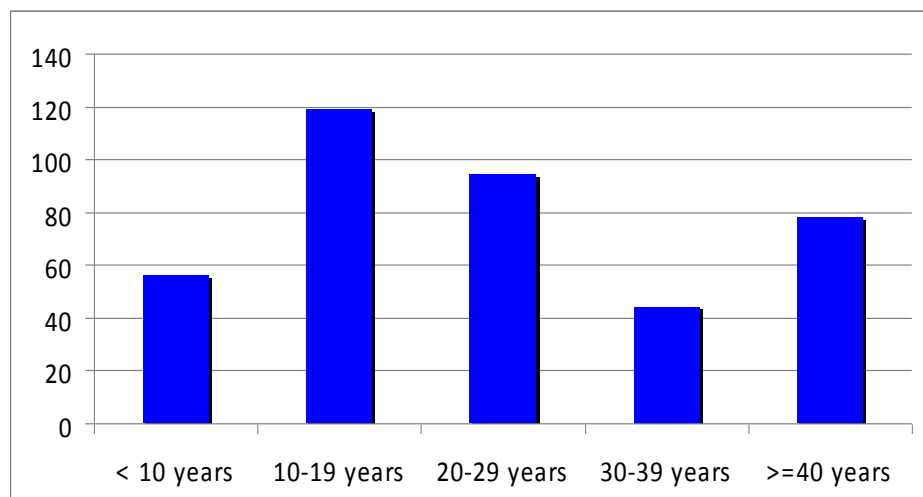
Características dos pacientes	Valor absoluto ou mediana
Idade	21 anos (2-75)
Sexo	215 M: 169 F
Etnia – branca	307 (80%)
Duração da doença	95 dias (2-4749)
Transfusões	12 (0-200)
Etiologia – Idiopática	300 (78,1%)
Tratamento	
Nenhum	229 (60%)
Prednisona (PRD)	64 (16,7%)
CSA ± PRD	39 (10,2%)
Andrógeno ± PRD	35 (9,1%)
Hemoglobina - g/dl	7,4 (2,7- 12)
Granulócitos - $\times 10^3/\mu\text{L}$	580 (0-6696)
<200	81 (21%)
200 – 500	96 (25%)
>500	207 (54%)
Plaquetas - $/\mu\text{L}$	12.000 (1000 – 200.000)
Medula óssea – celularidade	10% (1-30)
Seguimento	7 anos (0,2-23)

*HC-UFPR: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Ao diagnóstico a mediana de idade foi de 21 anos, intervalo entre o diagnóstico e o início do tratamento de 95 dias e 12 transfusões recebidas. Na maioria dos casos, a etiologia foi idiopática (78,1%). Houve predomínio discreto do sexo masculino. No sangue periférico, a mediana de Hemoglobina foi de 7,4 g/dL, granulócitos 580/uL, linfócitos 1674/uL, plaquetas 12.000 /uL e reticulócitos de 0,5% (valor corrigido) e a maioria sem tratamento prévio.

Quanto à faixa etária acometida, houve distribuição bimodal, principalmente entre os 10 e 29 anos, seguido pelos pacientes acima de 40 anos (figura 1). Pelos critérios de Camitta, houve predomínio das formas severa (297), sendo 80 deles classificados como muito severas.

Figura 1 – Distribuição por faixa etária de 384 pacientes com Anemia aplástica submetidos a tratamento com CSA e PRD (HC-UFPR*)



*HC-UFPR: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná/ Years = anos

O hemograma pré-tratamento, através da análise univariada, demonstrou que índice de reticulócitos > 0,5%, neutrófilos \geq 200, plaquetas \geq 12.000 tiveram significância estatística para sobrevida, porém sem correlação com contagem de linfócitos.

Duzentos e oito pacientes fizeram citogenética (54,2%), em 25 deles (12,1%) não se obteve metáfases, com 153 resultados normais e 30 (16,4%) com anormalidades ao diagnóstico (tabela 3). As alterações mais prevalentes foram: cariótipo complexo, monossomia do 5, del 11q23, todas com 10% de incidência (3/30) do total de casos. Monossomia do 7 e trissomia do 8 ocorreram em casos isolados. Não foi encontrada correlação dos achados citogenéticos com sobrevida global ou resposta clínica ao tratamento imunossupressor.

Tabela 3. Achados citogenéticos ao diagnóstico dos pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD (HC- UFPR)*

Citogenética (n=183 avaliáveis)	Número	Sobrevida global
Metáfases normais	153 (83,6%)	p = NS
Metáfases alteradas	30 (16,4 %)	p = NS
- cariótipo complexo	3/30	
- monossomia do 5	3/30	
- del 11q23	3/30	
- monossomia 7 (-7)	1/30	
- trissomia 8 (t8)	1/30	
- t14 / t15/ t21/t18 e outras	1/30 (cada alteração)	

p = NS (valor de p = não significativo)

*HC-UFPR: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Com relação à tipagem HLA, 227 pacientes tinham tipagem HLA classe I e apenas 142 de classe II, sendo possível avaliar a frequência do HLA-DR 15 em 36,6% dos pacientes com AA tipados (67% deles provenientes do sul do Brasil). O grupo controle de doadores saudáveis apresentou incidência de HLA-DR 15 em 20,9% (133/637), com características étnicas e geográficas semelhantes. Na observação da resposta ao tratamento imunossupressor ou sobrevida global, não foi encontrado correlação estatística ($p=0,927$).

A presença de clone HPN > 1% foi encontrado em 12 pacientes (9,7%) de 124 avaliáveis após 2000 e sem correlação positiva com resposta clínica ou sobrevida.

A sobrevida global foi de 61% (± 3), com mediana de seguimento de 7 anos (2,4 meses – 23 anos). Quando avaliadas por severidade, a sobrevida na forma não-severa apresentou 80% (± 5), seguido por 63% (± 4) na forma severa e 42% (± 6) nas muito severas ($p < 0,001$).

Ao observar a resposta ao tratamento: 51% tiveram algum grau de resposta, com vida normal e independente de transfusões aos dois anos de tratamento: 143 pacientes com resposta completa com sobrevida global (SG) 94% (± 2), 53 com resposta parcial (SG 78% ± 7), enquanto 36 pacientes não obtiveram resposta (SG 37% ± 9) e 152 restantes foram óbitos e perda de seguimento pela opção de tratamento em outros centros (número de 96 e 56 respectivamente) figura 2 (2 A,B,C,D). A maioria dos pacientes respondeu entre 3 e 6 meses do tratamento. Na população pediátrica (abaixo de 10 anos) os resultados foram similares.

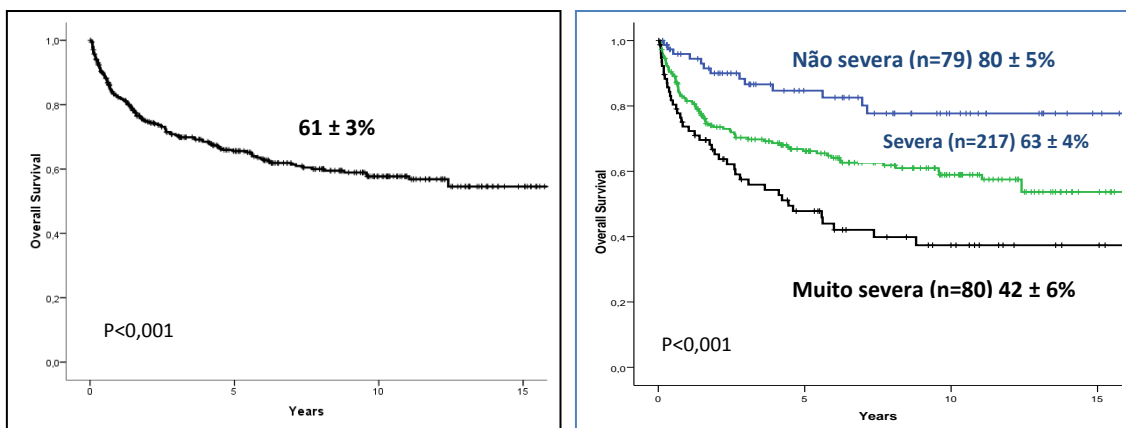


Figura A

Figura B

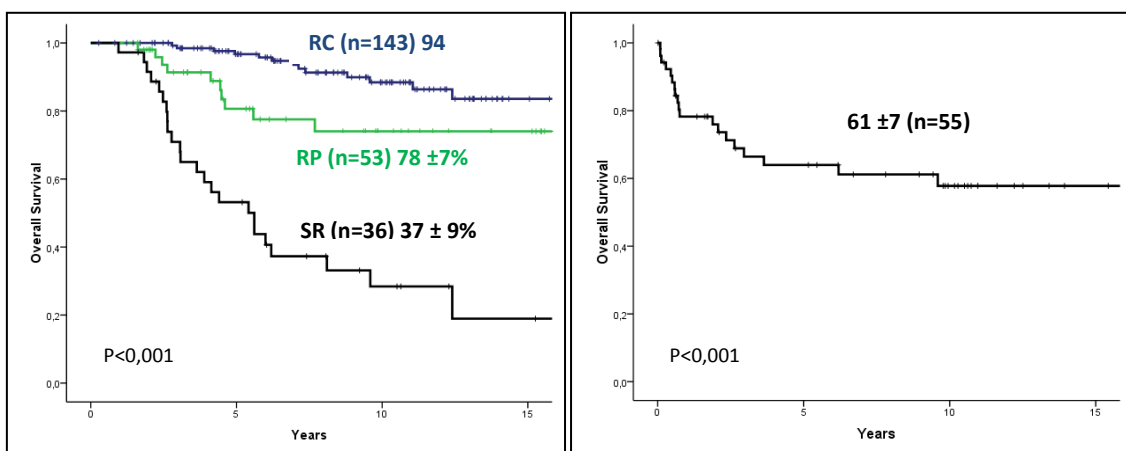


Figura 2C

Figura 2D

Figura 2A – Sobrevida global da população de 384 pacientes com anemia aplástica (AA) tratados com CSA e PRD (HC-UFPR)*. 2B – Sobrevida global de acordo com a severidade da doença. 2C – Sobrevida global relacionada a resposta após 2 anos de tratamento. 2D – Sobrevida global dos pacientes com AA < 10 anos de idade.

RC- resposta completa, RP- resposta parcial, SR- sem resposta.

*HC-UFPR: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Entre os pacientes que não responderam, recaíram ou tiveram evolução clonal para LMA/MDS ao longo do tratamento, 43 foram encaminhados para o TMO (39 aparentados/4 não-aparentados), 28 deles vivos aos 6 meses pós TMO.

A principal causa de óbito registrada foi infecção em 42,7% (62/145), com predomínio de infecções bacterianas em 85,5% e as infecções fúngicas

foram provavelmente subestimadas (tabela 4). As causas de óbito nos grupos com resposta completa (9%) e parcial (18,8%) foram similares ao grupo total, exceto por conter 75% das LMAs decorrentes da evolução clonal.

Tabela 4. Distribuição das causas de óbitos entre os pacientes com Anemia aplástica tratados com CSA e PRD (HC-UFPR)*.

Causas de óbito	Nº absoluto
Infecções	62
- bacterianas	50
- fúngicas	7
- virais	3
- não identificadas	2
Hemorragia	34
- SNC	20
- outros	14
Complicações TMO	13
Evolução clonal para LMA	4

SNC- sistema nervoso central, TMO – transplante de medula óssea, LMA – leucemia mieloide aguda.

*HC-UFPR: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Na análise univariada, idade < de 40 anos ($p= 0,014$), tratamento após o ano de 1997 ($p= 0,014$), < 15 unidades transfundidas ($p= 0,027$), neutrófilos ≥ 200 ($p<0,001$) e plaquetas ≥ 12.000 ($p= 0,002$) tiveram impacto na sobrevida global.

Na análise multivariada o número de neutrófilos $\geq 200/\mu\text{L}$ ($p= 0,009$), plaquetas $\geq 12.000/\mu\text{L}$ ($p=0,018$), reticulócitos $\geq 0,5\%$ ($p< 0,001$) e início do tratamento após o ano de 1997 ($p= 0,002$) apresentaram impacto na sobrevida global (tabela 5).

Tabela 5. Análise multivariada dos pacientes com anemia aplástica tratados com CSA e PRD de acordo com a sobrevida global (HC-UFPR)*.

	HR	IC 95%		P
Transfusões ≥ 15	1,62	1,15	2,30	0,006
Idade ≥ 40 anos	1,82	1,23	2,68	0,003
Período ≥ 1997	0,57	0,40	0,81	0,002
Plaquetas ≥ 12.000	0,64	0,45	0,93	0,018
Reticulócitos ≥ 0,5	0,42	0,29	0,60	< 0,001
Granulócitos ≥ 200	0,59	0,39	0,87	0,009

*HC-UFPR: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

A dependência à ciclosporina ocorreu em 10% no grupo avaliável em 2 anos (n = 343); com manutenção da droga a sobrevida ficou acima de 90%. A maioria eram homens (n=25), com mediana de idade de 22 anos e 10 transfusões recebidas pré-tratamento; 16 mantiveram resposta completa, 15 com resposta parcial e 3 perderam a resposta entre 3 e 11 meses (2 óbitos por infecção).

O uso adicional de corticóide causou efeitos adversos descritos como: hipertensão arterial 25,7% (sinergismo com CSA?), sobrepeso (descrição de fáscies cushingóide) em 13,5%, e diabetes secundário em 4,4 % com necessidade de medicação específica; a descrição de sépsis no prontuário foi encontrada apenas em 1,1%. A incidência de infecções não fatais não pode ser estimada de forma correta pela presença exclusiva do corticóide. Os efeitos colaterais relacionados à ciclosporina não foram descritos, pois esta medicação está presente em ambos os tratamentos ('standard' com ATG e alternativo com prednisona).

A incidência cumulativa de recaída foi de 28% (± 4) com mediana de 4,4 anos e possibilidade de recuperação com novo protocolo imunossupressor (figura 3). A taxa de evolução clonal foi de 7,81%(16 pacientes com HPN , 9 com MDS e 5 casos de LMA) figura 4.

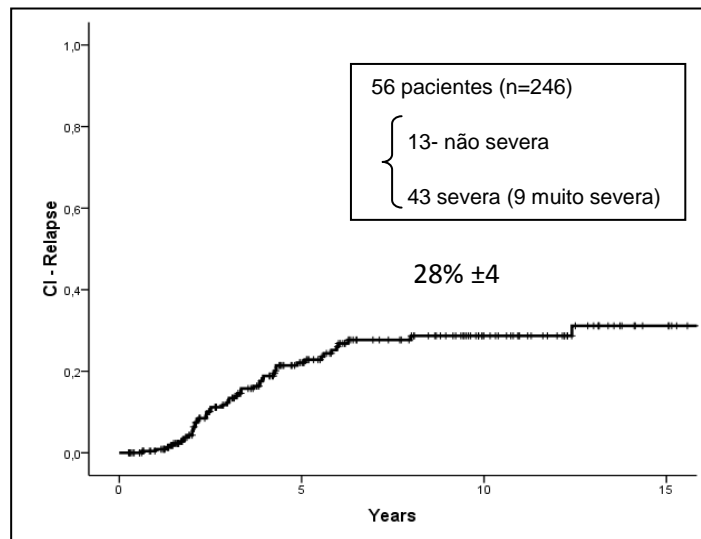


Figura 3: Incidência cumulativa de recaída nos pacientes com Anemia Aplástica tratados com CSA e PRD (HC-UFPR)*.

*HC-UFPR: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

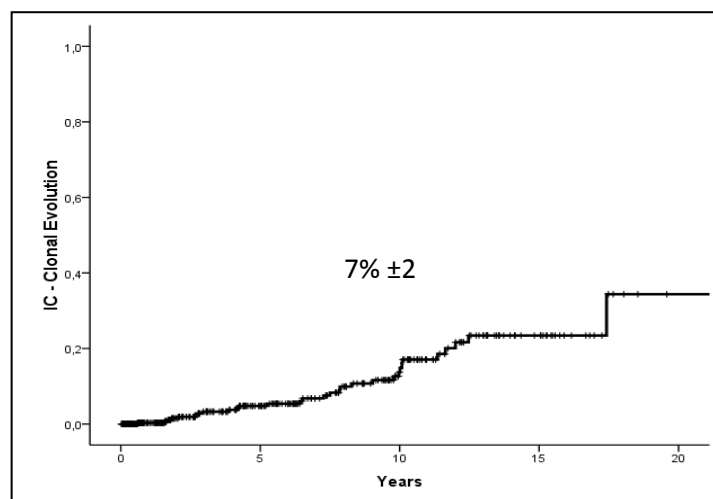


Figura 4: Incidência cumulativa de evolução clonal nos pacientes com Anemia aplástica tratados com CSA e PRD (HC-UFPR)*.

*HC-UFPR: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

5 DISCUSSÃO

A anemia aplástica (AA) segue como um paradigma nas síndromes de falência medular, pela morbimortalidade apresentada e a possibilidade de grande incremento na sobrevida quando o tratamento correto é instituído rapidamente, como o transplante de medula óssea ou a imunossupressão^{1,2}.

O 1º transplante de medula óssea da América Latina, realizado neste serviço (HC-UFPR) em 1979, foi em um paciente portador de anemia aplástica severa. Desde então, Curitiba tornou-se referência brasileira em falências medulares, seja aplasia adquirida como também constitucional, destacando a anemia de Fanconi.

A necessidade de atender os pacientes encaminhados ao Serviço de Transplante mas sem condições de submeterem-se ao procedimento, tornou imperativo uma alternativa de tratamento. Conforme discutido previamente, havia indisponibilidade de globulina anti-timocítica (no Brasil uso de ATG de coelho) para esse contingente de pacientes, levando a criação do protocolo de imunossupressão baseado em ciclosporina e prednisona. Apenas nos últimos anos a capacitação de outros centros proporcionou o tratamento dos pacientes nos seus locais de origem. Pode-se inferir então que os dados mostrados representam grande parte da realidade do país.

Os dados epidemiológicos são semelhantes à literatura: a AA não apresenta diferença na incidência por sexo, apesar da discreta predominância masculina (1,3♂ :1♀) neste trabalho. A maior incidência entre adolescentes e adultos jovens, seguido de um 2º pico tardio é bem conhecido, bem como a etiologia predominante ser idiopática¹⁻⁵.

Em nosso serviço, a mediana de tempo entre diagnóstico e início do tratamento é maior, podendo ser explicada pela demora no encaminhamento dos doentes, especialmente nos anos anteriores a 1995, quando se passou a fazer uma maior divulgação das peculiaridades desta doença, associado aos obstáculos naturais gerados pelos problemas sócio-econômicos da grande maioria dos nossos doentes³⁶.

Nos 208 pacientes com estudo citogenético, a dificuldade de obtenção de metáfases em mais 12% dos casos foi inferior a outros estudos, onde pode atingir até 40-50% no mesmo período. A frequência de anormalidades em 16,4% dos pacientes avaliáveis ficou acima da descrita em outras séries (4,6-12%), divergindo também na distribuição das alterações encontradas. Os achados de cariótipos complexos e monossomia do 5 estão descritos, porém com o predomínio da trissomia do 8 e monossomia do 7, situação não encontrada neste estudo. O achado de “del 11q 23” não está habitualmente descrito em AA, tendo um papel desconhecido. Frequentemente, estes clones anormais são pequenos e podem ser transitórios desaparecendo espontaneamente ou após o tratamento imunossupressor. Novos clones podem aparecer durante o seguimento, correlacionados ou não com evolução clonal; porém nesta análise não foi realizada avaliação citogenética seriada para observar este fenômeno^{1,23-28}.

A resposta ao tratamento imunossupressor ou sobrevida global, não foi influenciada pelas alterações citogenéticas presentes no diagnóstico ($p=ns$). Pelos casos isolados, a trissomia do 8 não pode ser avaliada como preditor de resposta à imunossupressão, como a monossomia do 7 para aumento do risco de evolução clonal para MDS/LMA.

A tipagem HLA faz parte do screening na abordagem da AA, para rápida identificação de possível doador HLA idêntico e encaminhamento ao transplante de medula óssea (TMO) nos pacientes < 40 anos (Marsh J et al)¹. Na população com tipagem HLA de classe II, a frequência do HLA-DR 15 (36,6%) foi inferior a outros grupos de AA e maior que na população saudável do grupo controle (20,8%). A população normal brasileira apresenta entre 12-21% do HLA-DR15; a população predominante do sul do Brasil, comporta a miscigenação resultado do longo período de colonização e imigração por parte dos grupos europeus e outros grupos étnicos. Algumas populações têm maior prevalência de acordo com sua etnia e localização geográfica, podendo chegar a valores de 50- 69% dos pacientes com AA^{29-32,35,36}. Ao observar a associação do HLA-DR 15 com a resposta ao tratamento com CSA e PRD, não houve significância estatística, como alguns estudos demonstraram previamente.

A porcentagem de pacientes com clones HPN ao diagnóstico ficou abaixo do descrito e sem correlação positiva com resposta e sobrevida. Estudos prospectivos poderão resultar em melhor avaliação, já que a população com imunofenotipagem realizada foi menos de 1/3 do total.

A sobrevida global de nosso estudo atingiu 61% (± 3) nesses 20 anos (mediana de 7 anos), assemelhando-se a diversas séries publicadas porém com tempo de seguimento menor. A taxa de resposta ao tratamento com CSA+ PRD de 51% aos 2 anos inclui o número considerável de óbitos ao longo do tratamento. Três séries de imunossupressão merecem destaque com ATG + CSA: o NIH (National Institutes of Health) publicou 122 casos de pacientes com AA forma severa, com sobrevida de 55% no seguimento de 7 anos (61% resposta aos 6 meses e 58% em 1 ano); já o grupo coreano com 83 pacientes

relatou sobrevida de 69% em 6 anos (resposta de 47% aos 6 meses) seguido pelo grupo alemão com 51 pacientes e 64% de sobrevida em 3,5 anos (resposta de 70% aos 6 meses)^{1,3,12,15}.

Como esperado, a sobrevida dos pacientes com resposta completa chegou a 94%, contrastando com o prognóstico reservado dos não respondedores (37%) e menor sobrevida da forma muito severa.

O grupo pediátrico abaixo de 10 anos, apresentou comportamento semelhante à população do estudo, embora se questione possíveis diferenças na etiopatogenia entre crianças e adultos.

Os fatores impactantes na sobrevida através da análise multivariada encontrados no hemograma (maiores contagens de neutrófilos / plaquetas / reticulócitos), refletem pacientes com provável maior reserva medular. Estudo recente (Scheinberg P et al 2009) demonstrou que valores do hemograma pré-tratamento como contagem absoluta de reticulócitos ($\geq 25 \times 10^9/l$) e de linfócitos ($\geq 1,0 \times 10^9/l$) foram preditores de resposta aos 6 meses de uso de ATG (cavalo) e CSA; a contagem de neutrófilos não apresentou associação pelo grande número de óbitos precoces nos pacientes com neutropenia severa^{1,34}, enquanto nosso estudo não encontrou associação com a contagem de linfócitos ao diagnóstico. Os demais fatores na análise multivariada, como menor número de transfusões, idade < 40 anos e ano de diagnóstico > 1997, demonstram pacientes mais jovens e menos sensibilizados por transfusão, além da melhoria na qualidade da assistência (hemoderivados filtrados/irradiados, melhoria do suporte antibiótico/antifúngico) a esta população.

Ao observarmos as causas de óbito, há destaque para infecção, como demonstra a literatura, seguida por sangramento (mais observado nos estudos antigos que os atuais). Houve preponderância das infecções bacterianas, com número muito reduzido de infecções fúngicas, provavelmente de forma subestimada e/ou subdiagnosticada no registro retrospectivo. A infecção fúngica sempre foi um grande problema nos pacientes com neutropenia severa e prolongada, principalmente na sua forma invasiva, porém a falta de métodos diagnósticos mais acurados no passado e a não realização de autópsias podem ter interferido diretamente na baixa incidência encontrada^{1,36-40}.

Com relação aos efeitos adversos, o uso da prednisona não aumentou de forma impactante o risco de mortalidade como visto pelos valores de sobrevida global. O alto índice de HAS (hipertensão arterial sistêmica) pode estar falsamente elevado pela associação com a ciclosporina; da mesma forma a obesidade e diabetes podem estar subestimados e ser mais prevalente em estudos prospectivos.

A recaída de 28% (± 4) se assemelha a estudos prévios, com mediana de 4,4 anos, sendo notável que possa haver o resgate com novo tratamento imunossupressor ou retirada lenta da CSA. Bacigalupo et al demonstrou que a retirada lenta pode reduzir em até 10% a taxa de recaída e mesmo no protocolo standard a recomendação atual é retirar em 12 meses, não mais em 6 meses. Nos pacientes com falha ao re-tratamento e mesmo aqueles sem resposta, existem hipóteses a serem questionadas: exaustão da reserva de células-tronco, imunossupressão insuficiente, erro diagnóstico ou formas hereditárias de falência medular sem mecanismo imune^{1,3,15,20,22}.

A evolução clonal (7,81%) ficou abaixo de séries com uso de ATG, embora a ocorrência de LMA em ambas apresente o pior prognóstico e necessidade de TMO como forma de tratamento efetivo. Da mesma forma, o fator resposta não influenciou ou protegeu desta evolução^{1-3,6,21}.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que a sobrevida global utilizando ciclosporina e prednisona é similar sem o uso de ATG, com período longo de seguimento.

Os pacientes com algum grau de resposta atingiram vida normal, livre de transfusões e infecções mesmo com contagens hematimétricas abaixo da normalidade.

A sobrevida foi influenciada pela contagem de neutrófilos, plaquetas, reticulócitos, bem como número de transfusões e idade do paciente ao diagnóstico, além do ano de início do tratamento.

A incidência de evolução clonal foi menor quando comparada aos trabalhos com ATG e CSA. Possíveis fatores preditivos de resposta ao tratamento imunossupressor ou sobrevida global como alteração citogenética ao diagnóstico, presença de HLA-DR 15 ou clone HPN não demonstraram poder estatístico, porém a obtenção de dados apresentou deficiências na sua natureza retrospectiva, sugerindo que trabalhos prospectivos possam avaliar melhor essas correlações.

Os efeitos adversos foram manejáveis, sendo necessário também acompanhamento prospectivo sobre tais ocorrências e graduações de forma mais fidedigna.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Marsh JCW, Ball SE, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anemia. *Br J Haematol.* 2009;147:47-70.
- 2- Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood.* 2006;108:2509-2519.
- 3- Maciejewski JP, Risitano AM. Aplastic Anemia: management of adults patients. *Hematology 2005 – ASH Educational Book, Blood.* 2005:110-117.
- 4- Maluf E, Hamerschlak N, Cavalcanti AB, et al. Incidence and risk factors of aplastic anemia in Latin American countries: the LATIN case-control study. *Haematologica.* 2009: 94(9).
- 5- Hamerschlak N, Maluf E, Pasquini et al. Aplastic anemia in Brazil: incidence and risk factors. *Am J Hematol.*2002;71:268-274.
- 6- Young NS, Bacigalupo A, Marsh JCW. Aplastic anemia: Pathophysiology and Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:119-125.
- 7- Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood.* 2008;111:4446-4455.
- 8- Camitta BM, Rapepport JM, Parkamn R et al. Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood.* 1975;45:355-363.
- 9- Bacigalupo A, Hows J, Gluckman R. Bone marrow transplantation versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anemia. *Br J Hematol.*1988;70-177.

- 10- Locasciulli A, Oneto R, Bacigalupo A et al. Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*. 2007;92:11-18.
- 11- Champlin RE, Perez WS, Passweg JR et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: a randomized controlled study of conditioning regimens. *Blood*. 2007;109:4582-4585.
- 12-Young NS. Immunosuppressive treatment of acquired aplastic anemia and immune-mediated bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol*. 2002;75:129-140.
- 13-Frickhofen N, Heipel H, Kaltwasser JP, et al. Antithymocyte globulin with or without cyclosporine A: 11 year follow up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. *Blood*. 2001;101, 1236-1242.
- 14- Bacigalupo A, Bruno B, Saraco P et al. Antilymphocyte globulin, cyclosporine, prednisolone and granulocyte colony stimulating factor for severe aplastic anemia: an update of the GITMO/EBMT study on 100 patients. *Blood*. 2000;95:1931-1934.
- 15- Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O et al. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia – Association between hematologic response and long term outcome. *JAMA*. 2003;289:1130-1135.
- 16-Bacigalupo A, Broccia G, Corda G et al. Antilymphocyte globulin, cyclosporin, and granulocyte colony-stimulating factor in patients with

- acquired severe aplastic anemia (SSA): a pilot study of the EBMT SAA working party. *Blood*.1995;85:1348-1353.
- 17- Passweg JR, Marsh JCW. Aplastic anemia: first-line treatment by immunosuppression and sibling marrow transplantation. *Educational Book ASH 2010*:36-42
- 18- Sanchez-Medal L, Gomez-Leal A, Duarte L et al. Anabolic androgenic steroids in the treatment of acquired aplastic anemia. *Blood*. 1969;34:283-300.
- 19- Frickhofen N, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H et al. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporine. *New Engl J Med*. 1991;324:1297-1304.
- 20- Schrezenmeier H, Marin P, Raghavachar A et al. Relapse of aplastic anemia after immunosuppressive treatment: a report from the European Bone Marrow Transplantation Group SAA Working Party. *Br J Hematol*. 1993;85:371-377.
- 21- Socie G, Rosenfeld S, Frickhofen N. Late clonal diseases of treated aplastic anemia. *Semin Hematol*. 2000;37:91-101.
- 22- Saracco P, Quarello p, Ioi AP et al. Cyclosporin A response and dependence in children with acquired aplastic anaemia: a multicenter retrospective study with long term observation follow up. *Br J Hematol*. 2008;140:197-205.
- 23- Maciejewski JP, Risitano A, Sloan EM. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood*.2002; 99:3129-3135.

- 24-Mikhailova N, Sessarego M, Bacigalupo A. Cytogenetic abnormalities in patients with severe aplastic anemia. *Haematologica*; 1996;81: 418-422.
- 25-Maciejewski JP, Selleri C. Evolution of clonal cytogenetic abnormalities in aplastic anemia. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:433-440.
- 26-Lee JH, Know KA, Lee S, et al. Incidence and clinical characteristics of clonal cytogenetic abnormalities of acquired aplastic anemia in adults. *Korean J Hematol* 2010;45:242-246.
- 27- Keung YK, Pettenati MJ, Powell BL et al. Bone marrow cytogenetic abnormalities of aplastic anemia. *Am J Hematol*. 2001;66:167-171.
- 28-Appelbaum FR, Barral J, Storb R et al. Clonal cytogenetic abnormalities in patients with otherwise typical aplastic anemia. *Exp Hematol*. 1987;15:1134-1139.
- 29- Sauntharajah Y, Nakamura R, John Barret A et al. HLA-DR 15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a reponse to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood*.2002;100:1570-1574.
- 30-Song EY, Jang HJ, Shin HY et al. Association of human leukocyte antigen class II alleles with response to immunosuppressive therapy in Korean aplastic anemia patients. *Human immunology*. 2010;7:88-92.
- 31-Nakao S, Takami N, Ueda M et al. Response to immunosuppressive therapy and na HLA-DRB1 allele in patients with aplastic anaemia: HLA-DR*1501 does not predict response to antithymocyte globulin. *Br J Haematol*. 1996;92:155-158.

- 32-Maciejewski JP, Follmann D, Nakamura R, et al. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the PNH/aplastic anemia syndrome. *Blood*. 2001;98:3513-3519.
- 33-Sugimori C, Chuhjo T, Feng X et al. Minor population of CD 55-CD59 blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood*. 2006;107:1308-1314.
- 34-Scheinberg P, Wu CO, Nunez O et al. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anemia. *Bj J Haematol*. 2008;144:206-216.
- 35-Yagasaki H, Yoshida N, Hirano N et al. Presence of HLA-DR15, a minor clone PNH, or an aplastic anemia-associated autoantibody do not predict a favorable response to immunosuppressive therapy in children with aplastic anemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2006;108:984.
- 36-Bitencourt MA. O tratamento da anemia aplástica severa adquirida com a combinação de ciclosporina e prednisona. Análise de 117 pacientes. Dissertação de mestrado, Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná. 1998.
- 37-Bicalho MG, Ruiz T, Costa SMC et al. Haplótipos HLA mais frequentes em doadores voluntários de medula óssea de Curitiba, Paraná. *Rev Bras Hematol*.2002
- 38-Valdez JM, Scheinberg P, Young NS et al. Infections in patients with aplastic anemia. *Semin Hematol*.2009;46:269.
- 39-Valdez JM, Scheinberg P, Nunez O et al. Decreased Infection-Related Mortality and Improved Survival in Severe Aplastic Anemia in the Past Two Decades. *Clinic Infect Disease*.2011;52:726-735.

40- Weinberger M, Elattar I, Marshall D et al. Patterns of infection in patients with aplastic anemia and the emergence of *Aspergillus* as a major cause of death. *Medicine (Baltimore)*. 1992;1:24-43.