

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÁRCIA REGINA SILVA QUIROGA

**AVALIAÇÃO DO QUIMERISMO EM PACIENTES COM ANEMIA APLÁSTICA
SEVERA ADQUIRIDA, APÓS 18 MESES DO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS, SUBMETIDOS A DIFERENTES
REGIMES DE CONDICIONAMENTO**

CURITIBA

2014

MÁRCIA REGINA SILVA QUIROGA

**AVALIAÇÃO DO QUIMERISMO EM PACIENTES COM ANEMIA APLÁSTICA
SEVERA ADQUIRIDA, APÓS 18 MESES DO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS, SUBMETIDOS A DIFERENTES
REGIMES DE CONDICIONAMENTO**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Medicina Interna, do Departamento de
Clínica Médica do Setor de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini
Coorientadora: Dr.^a Noemi Farah Pereira**

CURITIBA

2014

A todos os pacientes que em algum momento no percurso da existência, em meio à sua dor, entregaram suas esperanças de cura aos profissionais da área da saúde, bem como suas próprias vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini, pela orientação deste trabalho e oportunidade de expansão do conhecimento e crescimento profissional. Com ele aprendi não apenas o delineamento de uma pesquisa científica, mas também a ampliação da consciência no que se refere à responsabilidade que temos diante de cada paciente e a importância em relação à busca de terapias menos tóxicas, melhor qualidade de vida e melhor atendimento. Ensinou-me, com seu exemplo, que a dedicação e o amor com que executamos o nosso trabalho conduzem à eficiência e à ampliação do conhecimento. Sua experiência alicerçada ao longo de muitos anos de trabalho constitui-se em uma preciosa bagagem, que faz do convívio profissional uma oportunidade incomparável de aprendizado. Alguém que de forma destemida e ousada construiu um serviço de excelência na área de transplantes, deixando um legado para muitos que ainda virão.

À Dr.^a Noemi Farah Pereira, pelo apoio e incentivo a este trabalho, bem como em várias etapas da minha vida. Ao longo de muitos anos, empenhou-se em oferecer um serviço de qualidade na área de histocompatibilidade e, com abnegação e eficiência, sempre esteve comprometida com a busca de novas técnicas que possam auxiliar no tratamento ao paciente.

A toda equipe multidisciplinar do Serviço de Transplante de Medula Óssea, profissionais que com dinamismo e dedicação cuidam dos pacientes, sempre empenhados na busca de terapias mais adequadas que conduzam à cura da doença. Um agradecimento especial ao Dr. Marco Antônio Bitencourt e à Dr.^a Carmem Bonfim, pelas valiosas contribuições a este trabalho e por estarem sempre disponíveis a esclarecimentos e sugestões, que foram de suma importância ao longo desta pesquisa; profissionais que assumem no atendimento ao paciente um comprometimento incontestável com a vida que, por muitas vezes, viram esvaír-se na luta contra o tempo. Ao Dr. Samir Nabhan, pelos esclarecimentos estatísticos, e à Heliz Regina Neves, pelo auxílio em relação ao banco de dados.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Imunogenética que estiveram sempre ao meu lado em tantas etapas da minha vida, especialmente no decorrer da execução deste trabalho. Agradeço imensamente pelo incentivo, apoio, companheirismo, por tornarem esse caminho mais ameno e por terem me auxiliado nos infinitos detalhes que fazem parte de uma pesquisa científica. Sou infinitamente grata a todos aqueles que me ajudaram a superar limites, que me incentivaram a perseverar, que me conduziram ao descortinar do conhecimento e que celebraram comigo cada etapa concluída. Este trabalho traz um pouco de cada um de vocês. Minha gratidão à Marianna Monteiro, que me auxiliou em diversos períodos desta pesquisa, bem como na rotina laboratorial da Análise de Quimerismo. A toda equipe da Histocompatibilidade especialmente ao Joselito Getz, Márcia Melo, Luciana Dornelles, Alberto Lima, Bruno Zagonel, Roseli Silva, Divandrea Mátioski, Madalena Tomen, Fabiane Diesel e Carolina Dino. À Carmen Rebelatto e Alexandra Senegaglia do Cultivo Celular. À Ana Lucia Mion do setor de Biologia Molecular das doenças onco-hematológicas. À Daniela Pilonetto, do setor de Genética Molecular da Anemia de Fanconi. À equipe da Citogenética Tamara Borgonovo, Ana Teresa Braz, Valdevez Jamur, Lismeri Merfort e Miriam Barbosa. À Miriam Beltrame e Ana Paula Azambuja, do Laboratório de Imunofenotipagem.

Ao Dr. Marcelo Malaghini, do Instituto de Criminalística, por todas as sugestões e esclarecimentos e por inspirar-me com seu entusiasmo, profissionalismo e eficiência a trilhar a estrada quimérica pela qual me apaixonei.

Ao Dr. Geraldo Picheth, que me conduziu nos primeiros passos da minha vida profissional, por quem tenho profunda admiração por sua dedicação, competência e generosidade e por sua disposição em exercer a docência com tanta maestria.

À Marcia Olandoski, não somente pelo auxílio nas análises estatísticas, mas também pelo apoio e torcida em momentos importantes da minha vida.

À Associação de apoio ao Transplante de Medula Óssea Alirio Pfiffer, pelo incentivo à pesquisa.

Ao Dr. Helio Teive, coordenador da Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, e às secretarias Lucia e Valéria, pelo apoio.

Minha gratidão a todos os profissionais que participaram direta ou indiretamente desta pesquisa, que muitas vezes atuam nos bastidores e cujo trabalho é de extrema importância, compondo uma grande teia de auxílio ao paciente.

Àqueles amigos que transcendem o tempo e fazem com que nossa breve estada por aqui seja reportada à nossa essência e se consagre num caminho com bases no "Ser", não unicamente no "Ter", que se revela tão efêmero e mutável; que tornam nossos dias mais ensolarados e que conduzem a nossa consciência a lugares sagrados dentro de nós mesmos.

À minha família, pelo carinho e incentivo, em especial à minha mãe Ionete, que desde muito jovem abdicou de muitos dos seus sonhos para proporcionar a mim e aos meus irmãos melhores condições de estudo e que sempre nos conduziu dentro de princípios éticos. Ao meu pai Antônio, *in memoriam*, que nos deixou muito cedo.

Aos meus irmãos Junior e Magda que, silenciosamente, nos auxiliam e nos apoiam, deixando-nos a certeza da existência de alguém com quem se pode contar.

À minha tia materna Jandira, sempre muito presente em minha vida, que durante toda a sua existência exercitou a solidariedade e o amor ao próximo; que de forma altruísta deixa muito de si em nossas vidas.

Às minhas filhas Yasmin e Giovana, que me ensinam constantemente a arte de ser mãe. Ao longo de 19 anos de maternidade, conduziram-me a profundas reflexões de como educar, como exercitar o amor sem deixar de estabelecer limites, como ser presente sem ser invasivo, como tornar-se um porto seguro capaz de aconchegar e proteger, para onde possam sempre retornar. Por me conduzirem à compreensão de que não se pode

preparar o caminho para os filhos, mas sim os filhos para o caminho e por compreenderem a minha ausência em muitos momentos ao longo deste trabalho. Minha gratidão infinita por existirem e fazerem parte da minha vida, por tornarem os meus dias mais coloridos, alegres e iluminados.

*Se eu não puder aliviar a dor do próximo,
que eu nunca provoque dor, nem por
pensamentos, palavras ou atos.*

RESUMO

O resultado do transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) é avaliado por meio da recuperação hematológica e da análise do quimerismo. Este estudo tem como objetivo avaliar os níveis de quimerismo em pacientes com Anemia Aplástica Severa (AAS) Adquirida com mais de 18 meses de acompanhamento pós-TCTH, que apresentaram recuperação hematológica parcial ou completa no sangue periférico. Foram analisados 104 pacientes com AAS transplantados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e monitorados no período de 1987 a 2012. Os pacientes foram divididos em dois grupos, conforme o regime de condicionamento. Os pacientes do grupo I (n=55) receberam ciclofosfamida (CFA) isolada, 200 mg/Kg de peso corpóreo e os do grupo II (n=49) CFA, 120 mg/Kg de peso corpóreo, associada ao bussulfano (BUS), 12 mg/Kg de peso corpóreo. Cada grupo foi subdividido de acordo com os seguintes níveis de quimerismo em relação às células do doador: $\leq 50\%$, entre 51 e 90% e $>90\%$. A análise de quimerismo foi realizada pela amplificação de locos VNTRs/STRs com detecção dos fragmentos em gel de poliacrilamida e coloração com sais de prata (84 pacientes) até julho de 2009 e após esse período por eletroforese capilar em Analisador Genético de DNA (20 pacientes). Os níveis de quimerismo foram correlacionados com as variáveis pré-transplante (idade e sexo do paciente e intervalo entre o diagnóstico e o TCTH), variáveis do transplante (idade e sexo do doador e número de células infundidas) e variáveis pós-transplante (número de neutrófilos, plaquetas e dosagem de hemoglobina após 18 meses do transplante). A análise dos resultados mostrou associação entre os níveis de quimerismo e os tipos de condicionamento empregados ($p < 0,001$). A recuperação autóloga (quimerismo $\leq 50\%$) foi encontrada em 36,4% dos pacientes do grupo I e em nenhum dos pacientes do grupo II. Quimerismo entre 51 e 90% foi identificado em 11 pacientes (20,0%) do grupo I e em 5 pacientes (10,2%) do grupo II. Quimerismo $>90\%$ foi mais frequente no grupo II (89,8%) quando comparado ao grupo I (43,6%). As características pré-transplante (idade e sexo do paciente e intervalo entre o diagnóstico e o TCTH) e do transplante (idade e sexo do doador) não mostraram associação ao quimerismo em nenhum dos grupos. O maior número de células infundidas mostrou associação com níveis de quimerismo mais elevados nos pacientes do grupo I ($p = 0,013$) e não apresentou associação nos do grupo II. A análise multivariada mostrou que o nível de quimerismo $>90\%$ está associado ao condicionamento com CFA+BUS ($p < 0,001$) e ao maior número de células infundidas ($p = 0,009$). A recuperação hematológica, avaliada com base no último hemograma disponível, mostrou associação entre o número mais elevado de neutrófilos ($p = 0,003$) e de plaquetas ($p < 0,001$) e maior grau de quimerismo nos pacientes do grupo I. A dosagem de hemoglobina não mostrou associação com o quimerismo nos dois regimes de condicionamento. Este estudo sugere que o condicionamento com CFA associada ao BUS e o maior número de células infundidas são fatores preditivos da evolução do enxerto alogênico de células-tronco hematopoéticas. Os resultados deste estudo reforçam que a recuperação autóloga da hematopoese depende da intensidade da imunossupressão exigida para cada caso e que a função imunossupressora da CFA isolada pode induzir a regeneração hematológica autóloga.

Palavras-chave: Anemia Aplástica Severa. Transplante de células-tronco hematopoéticas. Condicionamento. Quimerismo.

ABSTRACT

The outcome of hematopoietic stem cell transplantation is evaluated (HSCT) by hematologic recovery and chimerism analysis. The aim of this study is to assess the levels of chimerism in Acquired Severe Aplastic Anemia (SAA) patients with post-transplant follow up of 18 months or more, and that have showed partial or complete hematologic recovery in peripheral blood. A total of 104 SAA patients transplanted at the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná and monitored from 1987 to 2012 were analyzed. Patients were divided into two groups on the basis of the conditioning regimen. Group I (n=55) received only cyclophosphamide (CY) at 200mg/kg of body weight, while those of group II (n=49) received CY at 120mg/kg of body weight associated with busulfan (BUS) at 12mg/kg of body weight. Each group was then subdivided according to the following levels of chimerism in relation to the donor's cells: $\leq 50\%$, from 51 to 90%, and $>90\%$. Chimerism analysis was performed by amplification of VNTR/STR *loci* followed by detection of fragments in polyacrylamide silver stained gels (84 patients) until July of 2009 and, from then on, by capillary electrophoresis in DNA Genetic Analyser (20 patients). Levels of chimerism were correlated to pre-transplant (patient's age, sex, and time elapsed from diagnosis to HSCT), transplant (donor's age, sex, and number of infused cells) and post-transplant (number of neutrophils and platelets, and hemoglobin levels from 18 months on after transplant) variables. Data analysis showed an association between the levels of chimerism and the different conditioning regimens ($p < 0.001$). Autologous recovery (chimerism $\leq 50\%$) was achieved by 36.4% of patients from group I and by none of those from group II. Chimerism ranging from 51 to 90% was identified in 11 patients (20.0%) from group I and in 5 patients (10.2%) from group II. Levels of chimerism $>90\%$ were more frequent in group II (89.8%) than in group I (43.6%). Pre-transplant (patient's age, sex, and time elapsed from diagnosis to HSCT) and transplant (donor's age and sex) characteristics did not show association with chimerism in either one of the groups. The largest number of infused cells showed association with higher levels of chimerism in patients from group I ($p = 0.013$), but not with those in group II. Multivariate analysis indicated that the chimerism level $>90\%$ is associated with the conditioning regimen CY+BUS ($p < 0.001$) and with the highest number of infused cells ($p = 0.009$). Hematologic recovery evaluated on the basis of the last available blood count indicated an association of the largest number of neutrophils ($p = 0.003$) and platelets ($p < 0.001$) with the highest level of chimerism in patients from group I. Hemoglobin levels did not show any association with chimerism in either one of the groups. This study suggests that the conditioning regimen with CY and BUS as well as the highest number of infused cells are predictive factors of the establishment of hematopoietic stem cell allogeneic graft. The results of this study corroborate that hematopoietic autologous recovery relies on the intensity of immunosuppression needed for each case, and that the immunosuppressive function of CY alone can induce autologous hematologic recovery.

Keywords: Severe Aplastic Anemia. Hematopoietic stem cell transplantation. Conditioning regimen. Chimerism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DETECÇÃO DOS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES AOS ALELOS DO TRIPLEX I (LOCOS D1S80, SE33, HumTH01) E DO TRIPLEX II (LOCOS 33.6, HumARA, HumTPO) EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO COM SAIS DE PRATA.....	41
FIGURA 2 - DETECÇÃO DOS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES AOS ALELOS DOS LOCOS D8S1179, D21S11, D7S820 E CSF1PO POR ELETROFORESE CAPILAR EM ANALISADOR GENÉTICO DE DNA (ABI3130).....	44
FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO QUIMERISMO.....	45
GRÁFICO 1 - ASSOCIAÇÃO ENTRE REGIME DE CONDICIONAMENTO E QUIMERISMO ($p=0,001$)	47

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DA ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA	19
QUADRO 2 - CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA.....	35
QUADRO 3 - INTERPRETAÇÃO DO PADRÃO ELETROFORÉTICO DOS LOCOS VNTRs/STRs E DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE QUIMERISMO APÓS O TCTH	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS PRÉ-TRANSPLANTE	36
TABELA 2 -	CARACTERÍSTICAS DO TRANSPLANTE	37
TABELA 3 -	CARACTERÍSTICAS DOS LOCOS VNTRs/STRs DOS TRIPLEX I E II.....	40
TABELA 4 -	CARACTERÍSTICAS DOS LOCOS STR DO <i>KIT AmpF^lSTR</i> <i>Identifiler</i>	43
TABELA 5 -	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS PRÉ-TRANSPLANTE (IDADE DO PACIENTE E INTERVALO ENTRE O DIAGNÓSTICO E O TCTH) NOS PACIENTES DO GRUPO DA CFA ISOLADA	48
TABELA 6 -	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E SEXO DO PACIENTE NO GRUPO DA CFA ISOLADA	48
TABELA 7 -	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS PRÉ-TRANSPLANTE (IDADE DO PACIENTE E INTERVALO ENTRE O DIAGNÓSTICO E O TCTH) NOS PACIENTES DO GRUPO DA CFA+BUS	49
TABELA 8 -	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E SEXO DO PACIENTE NO GRUPO DA CFA+BUS	49
TABELA 9 -	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS DO TRANSPLANTE (IDADE DO DOADOR E NÚMERO DE CÉLULAS INFUNDIDAS) NOS PACIENTES DO GRUPO DA CFA ISOLADA	50
TABELA 10 -	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E SEXO DO DOADOR NO GRUPO DA CFA ISOLADA	50
TABELA 11 -	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS DO TRANSPLANTE (IDADE DO DOADOR E NÚMERO DE CÉLULAS INFUNDIDAS) NOS PACIENTES DO GRUPO DA CFA+BUS	51
TABELA 12 -	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E SEXO DO DOADOR NO GRUPO DA CFA+BUS	51
TABELA 13 -	ANÁLISE MULTIVARIADA.....	52

TABELA 14 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS PÓS-TRANSPLANTE (NÚMERO DE NEUTRÓFILOS, DOSAGEM DE HEMOGLOBINA E CONTAGEM DE PLAQUETAS APÓS 18 MESES DO TCTH) NO GRUPO DA CFA ISOLADA	53
TABELA 15 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS PÓS-TRANSPLANTE (NÚMERO DE NEUTRÓFILOS, DOSAGEM DE HEMOGLOBINA E CONTAGEM DE PLAQUETAS APÓS 18 MESES DO TCTH) NO GRUPO DA CFA+BUS	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	- Anemia Aplástica
AAS	- Anemia Aplástica Severa
ALDH	- Aldeído desidrogenase
GAL	- Globulina antilinfocítica
GAT	- Globulina antitimocítica
BUS	- Bussulfano
CFA	- Ciclofosfamida
CSA	- Ciclosporina-A
DECH	- Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
DLI	- Infusão de Linfócitos do Doador
FISH	- Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência
HC	- Hospital de Clínicas
HLA	- Antígeno Leucocitário Humano
HPN	- Hemoglobinúria Paroxística Noturna
INF- γ	- Interferon gama
MDS	- Síndrome mielodisplásica
MO	- Medula Óssea
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PDR	- Prednisona
RA	- Recuperação autóloga
RFLP	- Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
STMO	- Serviço de Transplante de Medula Óssea
STR	- Repetições Curtas em Tandem
TCTH	- Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
TMO	- Transplante de Medula Óssea
UAD	- Unidade de Apoio Diagnóstico
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VNTR	- Número Variável de Repetições em Tandem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA ANEMIA APLÁSTICA	19
1.2.1 Incidência.....	19
1.2.2 Etiologia.....	19
1.2.3 Fisiopatologia.....	20
1.2.4 Classificação.....	20
1.3 TRATAMENTO DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA	21
1.3.1 Terapia imunossupressora	22
1.3.2 Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas.....	23
1.3.2.1 Condicionamento.....	24
1.3.2.2 Complicações pós-transplante	25
1.4 ANÁLISE DE QUIMERISMO	26
1.4.1 Métodos de detecção do quimerismo	27
1.4.2 Níveis de quimerismo	29
1.4.3 Recuperação hematopoética autóloga	29
1.4.4 Impacto do regime de condicionamento no quimerismo.....	30
1.4.5 Importância da análise de quimerismo na clínica	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
3.1 CARACTERÍSTICAS PRÉ-TRANSPLANTE, DO TRANSPLANTE E PÓS-TRANSPLANTE	36
3.1.1 Características pré-transplante.....	36
3.1.2 Características do transplante	36
3.1.3 Características pós-transplante	38
3.2 MÉTODOS.....	38
3.2.1 Isolamento do DNA genômico	39

3.2.2	Amplificação dos locos VNTRs e STRs pela PCR com detecção dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida e coloração com sais de prata	39
3.2.2.1	Amplificação do DNA.....	39
3.2.2.2	Corrida eletroforética	40
3.2.2.3	Análise dos resultados.....	40
3.2.3	Amplificação dos locos STRs pela PCR utilizando <i>primers</i> marcados com fluorescência e detecção dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar.....	41
3.2.3.1	Amplificação do DNA.....	41
3.2.3.2	Corrida eletroforética	42
3.2.3.3	Análise dos resultados.....	43
3.2.4	Interpretação dos resultados e determinação do nível de quimerismo	45
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4	RESULTADOS	47
4.1	CONDICIONAMENTO E QUIMERISMO	47
4.2	CARACTERÍSTICAS PRÉ-TRANSPLANTE E QUIMERISMO	48
4.2.1	Condicionamento com CFA isolada.....	48
4.2.2	Condicionamento com ciclofosfamida associada ao bussulfano	49
4.3	CARACTERÍSTICAS DO TRANSPLANTE E QUIMERISMO	50
4.3.1	Condicionamento com ciclofosfamida isolada	50
4.3.2	Condicionamento com ciclofosfamida associada ao bussulfano	51
4.4	ANÁLISE MULTIVARIADA	51
4.5	CARACTERÍSTICAS PÓS-TRANSPLANTE E QUIMERISMO.....	52
4.5.1	Condicionamento com ciclofosfamida isolada	53
4.5.2	Condicionamento com ciclofosfamida associada ao bussulfano	53
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE 1 - NÚMERO DE TRANSFUSÕES, TIPO DE CONDICIONAMENTO, DATA DO TMO, DATA DA AMOSTRA PÓS-TMO E RESULTADO DO QUIMERISMO	80
	APÊNDICE 2 - PACIENTES COM QUIMERISMO ≤50% DOADOR (CONDICIONAMENTO, NÚMERO DE NEUTRÓFILOS,	

HEMOGLOBINA, NÚMERO DE PLAQUETAS E RESULTADO DO QUIMERISMO).....	82
APÊNDICE 3 - PACIENTES COM QUIMERISMO ENTRE 51 E 90% DOADOR (CONDICIONAMENTO, NÚMERO DE NEUTRÓFILOS, HEMOGLOBINA, NÚMERO DE PLAQUETAS E RESULTADO DO QUIMERISMO)	83
APÊNDICE 4 - PACIENTES COM QUIMERISMO >90% DOADOR (CONDICIONAMENTO, NÚMERO DE NEUTRÓFILOS, HEMOGLOBINA, NÚMERO DE PLAQUETAS E RESULTADO DO QUIMERISMO).....	84
APÊNDICE 5 - CARACTERÍSTICAS PRÉ-TRANSPLANTE, DO TRANSPLANTE E PÓS- TRANSPLANTE NO GRUPO DA CFA ISOLADA E CFA ASSOCIADA AO BUSSULFANO	86
ANEXO - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HC-UFPR.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Anemia Aplástica (AA) é uma doença rara e heterogênea caracterizada por pancitopenia no sangue periférico, associada a uma medula óssea (MO) hipocelular e sem evidência de infiltração neoplásica, mieloproliferativa ou fibrose, cujos primeiros sintomas incluem fadiga, fraqueza, hemorragias de gengiva, pele, nariz e trato gastrointestinal devido à trombocitopenia (WINTROBE; LEE, 1993; KEOHANE, 2004; PASQUINI; BITENCOURT; MEDEIROS, 2013).

A principal causa de morte da doença são as infecções fúngicas; no entanto hemorragias, evolução para doenças clonais (síndrome mielodisplásica, leucemia, hemoglobinúria paroxística noturna) e sobrecarga de ferro transfusional são outras causas de morbidade e mortalidade (BRODSKY *et al.*, 2010).

O primeiro relato sobre falência medular foi realizado em 1888 por Paul Erlich, que descreveu o caso de uma mulher jovem com anemia grave, de evolução rápida e que foi a óbito em decorrência da doença. O quadro descrito evidenciou anemia severa, sangramento na pele, retina e febre alta (WINTROBE; LEE, 1993; YOUNG; ALTER, 1994).

No início dos anos 50, o termo AA passou a ser usado nos casos caracterizados por pancitopenia e hipoplasia medular, sem outra evidência de doença primária capaz de produzir uma supressão do tecido hematopoético. Posteriormente, passou a ser empregado quando a medula apresentava-se hipocelular e substituída por tecido adiposo (JANDL, 1987; WINTROBE; LEE, 1993; YOUNG, 2002; KEOHANE, 2004).

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA ANEMIA APLÁSTICA

1.2.1 Incidência

A incidência da AA varia geograficamente de dois a seis casos por milhão de habitantes/ano. O maior trabalho epidemiológico existente foi realizado na Europa e em Israel no início da década de 1980 pelo *International Aplastic Anemia and Agranulocytosis Study*. Foi analisado um total de 112 milhões de pessoas e identificados 208 casos da doença, tendo uma incidência global de 2 casos/10⁶ habitantes/ano. Esse trabalho mostra que a ocorrência é maior em mulheres (2,3 casos/10⁶/ano) que em homens (1,2 casos/10⁶/ano) (KAUFMAN *et al.*, 1996). Outro estudo realizado na Tailândia mostrou uma incidência de 3,7 casos/10⁶ habitantes/ano na região de Bangkok (ISSARAGRISIL *et al.*, 1991). No Brasil, no Estado do Paraná, foi encontrada uma incidência de 2,4 casos/10⁶ habitantes/ano e em Curitiba, de 2 casos/10⁶ habitantes/ ano (MALUF *et al.*, 2002).

1.2.2 Etiologia

A Anemia Aplástica é um grupo heterogêneo de doenças que podem ser causadas por agentes físicos ou químicos, drogas e agentes virais como resultado da ação direta ou mediadas por um mecanismo imune. No Quadro 1 encontram-se relacionadas algumas das possíveis causas da AA (YOUNG; ALTER, 1994; PASQUINI, 2009).

TOXICIDADE DIRETA	CAUSAS MEDIADAS POR MECANISMO IMUNE
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Causas iatrogênicas: <ul style="list-style-type: none"> - Irradiação e quimioterapia - Benzeno ▪ Metabólitos intermediários de drogas comuns 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Causas iatrogênicas: <ul style="list-style-type: none"> - Doença do enxerto contra hospedeiro ▪ Fasciíte eosinofílica associada à hepatite ▪ Gestação ▪ Metabólitos de algumas drogas comuns associada à hemoglobinúria paroxística noturna ▪ Idiopática: 70 a 80%

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DA ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA

FONTE: Pasquini (2009)

1.2.3 Fisiopatologia

Os possíveis mecanismos envolvidos na patogenia da AA incluem lesão intrínseca da célula-tronco hematopoética, supressão imune da hematopoese, perturbações do microambiente da MO, mutações no gene da telomerase e encurtamento telomérico (NISSEN-DRUEY, 1989; CALADO; YOUNG, 2008; ZHAO *et al.*, 2013).

Décadas atrás, a partir da recuperação da hematopoese em pacientes que tiveram falha do enxerto após o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), inferiu-se que esse processo era devido a um mecanismo imunológico para AA, sendo que a recuperação autóloga (RA) de células sanguíneas foi creditada ao regime de condicionamento. A capacidade de resposta da AA para terapias imunossupressoras continua sendo a melhor evidência para uma fisiopatologia imunológica (YOUNG; MACIEJEWSKI, 1997).

Muitos dados laboratoriais suportam a hipótese de que, na maioria dos pacientes com AA, os linfócitos são responsáveis pela destruição das células hematopoéticas no compartimento medular (YOUNG, 2002). Alguns experimentos mostram que os linfócitos T suprimem a hematopoese ao produzirem fatores inibitórios, que foram identificados como interferon gama (INF γ) e fator de necrose tumoral (TNF). A detecção, por citometria de fluxo, de INF γ intracelular em amostras de pacientes pode estar relacionada com a capacidade de resposta à terapia imunossupressora e pode prever a recaída da doença (TONG *et al.*, 1991; SELLERI *et al.*, 1995; YOUNG; MACIEJEWSKI, 1997; SLOAND *et al.*, 2002).

1.2.4 Classificação

A Anemia Aplástica pode ser etiologicamente classificada em adquirida ou constitucional. Não havendo evidência de fatores inatos que possam predispor ao seu desenvolvimento é considerada adquirida. Estas podem ser de origem idiopática ou decorrente de radiações ionizantes, agentes químicos, drogas, infecções virais, doenças imunes e gravidez. Quando existe associação a determinadas doenças

genéticas, congênitas ou familiares, é classificada como constitucional. A forma mais frequente da anemia constitucional é a Anemia de Fanconi, que na maioria dos casos é uma doença autossômica recessiva (YOUNG; ALTER, 1994; MONTANÉ *et al.*, 2008; PASQUINI; BITENCOURT; MEDEIROS, 2013).

A Anemia Aplástica é classificada quanto a sua gravidade em moderada, severa ou muito severa. Os critérios hematológicos para definir a Anemia Aplástica Severa (AAS) compreendem a presença de dois ou três dos seguintes parâmetros no sangue periférico: neutrófilos $<500/\mu\text{L}$, plaquetas $<20.000/\mu\text{L}$ e contagem de reticulócitos corrigida $<1\%$ na presença de anemia, os quais devem estar associados à celularidade da MO inferior a 30% (moderadamente hipocelular) ou 20% (intensamente hipocelular). A forma muito severa é aquela que apresenta neutrófilos $<200/\mu\text{L}$, enquanto a forma moderada não atinge os valores acima discriminados (CAMITTA *et al.*, 1979; BACIGALUPO *et al.*, 1988; DEZERN; BRODSKY, 2011; PASQUINI; BITENCOURT; MEDEIROS, 2013).

1.3 TRATAMENTO DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA

Os principais tratamentos para AAS incluem o TCTH alogênico e a terapia imunossupressora com globulina antitimocítica (GAT), globulina antilinfocítica (GAL), ciclosporina-A (CSA) e corticoesteróides (BACIGALUPO *et al.*, 2000; FRICKHOFEN *et al.*, 2003; LOCASCIULLI *et al.*, 2007; PEINEMANN *et al.*, 2011; PASQUINI; BITENCOURT; MEDEIROS, 2013). A escolha da terapia é baseada na gravidade da doença, na idade do paciente e na disponibilidade de doador compatível quanto aos antígenos leucocitários humanos (HLA - *Human Leukocyte Antigen*).

A estimativa de sobrevida livre de eventos após cinco anos do TCTH ou a da terapia imunossupressora é baseada na gravidade da doença e na idade do paciente. Pacientes jovens com baixa contagem de neutrófilos tem uma vantagem significativa ao realizarem o TCTH, enquanto os pacientes de idade avançada e contagem alta de neutrófilos apresentam melhores resultados com o tratamento imunossupressor (ARMAND; ANTIN, 2007; BACIGALUPO, 2008).

O tratamento ideal para pacientes com AAS deveria apresentar baixo nível de toxicidade, capacidade de restaurar a hematopoese sem dependência de longas

terapias e eliminar o risco de doenças clonais tardias, como a Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) e a Síndrome Mielodisplásica (MDS). Assim, decisões relacionadas ao tratamento devem ser baseadas na toxicidade precoce e complicações tardias da doença (SOCIÉ *et al.*, 2000; DEZERN; BRODSKY, 2011).

1.3.1 Terapia imunossupressora

A terapia imunossupressora é recomendada para pacientes que não encontram doador irmão HLA compatível ou não são candidatos elegíveis para o TCTH (MARSH *et al.*, 2009; BRODSKY *et al.*, 2010; DEZERN; BRODSKY, 2011). O regime imunossupressor composto de GAT e CSA induz a uma resposta hematopoética em 60 a 70% dos pacientes e a probabilidade de sobrevida em cinco anos varia de 60 a 85%. Todavia, mais de 40% dos pacientes eventualmente recaem e um adicional de 10 a 40% desenvolvem uma doença clonal secundária. Uma vantagem do TCTH sobre o tratamento imunossupressor é uma redução acentuada tanto do risco de recaída como a evolução tardia para uma doença clonal como a MDS e a HPN (FRICKHOFEN *et al.*, 2003; ROSENFELD *et al.*, 2003; MACIEJEWSKI; RISITANO, 2005; BRODSKY *et al.*, 2010; DEZERN; BRODSKY, 2011).

O Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em virtude do suprimento irregular da GAT no Brasil, iniciou em 1989 um protocolo que combinava CSA e prednisona, com o intuito de proporcionar um tratamento adequado aos portadores de AAS sem doador HLA compatível ou que não apresentavam condições clínicas para submeter-se ao TCTH (BITENCOURT, 1998). Após 20 anos de experiência utilizando esse protocolo, Medeiros (2011) demonstrou que a incidência de evolução clonal foi menor quando comparada aos resultados da literatura com pacientes submetidos à combinação de CSA e GAT.

1.3.2 Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas

Inúmeros avanços possibilitaram que o TCTH fosse realizado entre indivíduos histocompatíveis, e esse procedimento tem sido efetivo na reconstituição da hematopoese normal em pacientes com desordens malignas e não malignas (DUFOUR *et al.*, 1999; KHAN; AGARWAL; AGRAWAL, 2004).

Jan van Rood (1958) e Jean Dausset e colaboradores (1965) (citados por ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011) descobriram as moléculas do sistema HLA que são codificadas por genes localizados no complexo principal de histocompatibilidade humano. Esses genes de acentuado polimorfismo codificam um número elevado de proteínas HLA, que por serem aloantígenos potentes são considerados os fatores genéticos mais importantes na rejeição ou na pega de tecidos enxertados. O desenvolvimento de métodos de tipificação HLA possibilitou a identificação das variantes alélicas destes genes e, conseqüentemente, a seleção de doadores HLA compatíveis para os pacientes com indicação de TCTH (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; PEREIRA; PASQUINI, 2013).

Uma alternativa de cura para a maioria dos pacientes com AAS é o TCTH com doador irmão HLA compatível. Transplante com doador não aparentado e com alguma incompatibilidade também constitui uma alternativa potencial de cura para a doença, mas é reservado para uma terapia de segunda linha, devido seu grau de morbidade e mortalidade (BRODSKY *et al.*, 2010; DEZERN; BRODSKY, 2011; WANG *et al.*, 2013).

O primeiro transplante de medula óssea (TMO) da América Latina em paciente portador de AAS foi realizado pelo STMO do HC-UFPR em 1979, que a partir dessa data tornou-se referência para o tratamento da doença.

Vários fatores que influenciam na sobrevida após o TCTH já foram descritos, dentre os quais: idade do receptor, sexo do doador, intervalo entre o diagnóstico e o transplante, infecções graves antes do transplante, número de transfusões prévias, tipo de condicionamento, número de células infundidas e tipo de imunoprofilaxia para a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (STORB; PRENTICE; THOMAS, 1977; GLUCKMAN *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 2003; GEORGE *et al.*, 2007). Os resultados com TCTH alogênico são melhores em crianças, comparado aos adultos especialmente naqueles com idade acima de 40 anos, devido às complicações provenientes da

DECH (BRODSKY *et al.*, 2010). Mais de 90% dos pacientes alcançam a cura definitiva quando recebem menos de 15 transfusões e quando o tempo entre o diagnóstico e o transplante é inferior a dois meses (PASQUINI, 1991).

1.3.2.1 Condicionamento

Nos TCTH alogênicos são empregados regimes de condicionamento convencionais ou mieloablativos, de intensidade reduzida e os não mieloablativos. Regimes mieloablativos produzem profunda pancitopenia e mieloablação e necessitam de suporte de células-tronco para resgatar a função medular. Regimes não mieloablativos produzem mínima citopenia e não requerem suporte de células-tronco. Condicionamento de intensidade reduzida é uma categoria intermediária de regime que não preenche os critérios de regimes mieloablativos ou não mieloablativos (BACIGALUPO *et al.*, 2009).

Condicionamentos mieloablativos incluem combinações de agentes quimioterápicos em altas doses, como ciclofosfamida (CFA) e bussulfano (BUS), associados ou não à radioterapia corporal, com a finalidade de: 1) destruir as células tumorais permitindo a cura da doença de base; 2) criar espaço na MO para que ocorra o enxerto das células-tronco hematopoéticas; 3) destruir o sistema imunológico. Na AA e em outras doenças autoimunes apenas a última função é necessária para se obter sucesso no transplante (VOLTARELLI; STRACIERI, 2000).

O BUS é um agente alquilante comumente utilizado como parte do regime de condicionamento como um agente mieloablativo, embora possua limitada atividade imunossupressora. A combinação da CFA e BUS resulta na erradicação efetiva da MO do receptor e supressão da resposta imune, permitindo assim a pega do enxerto (SANTOS, 1993; DULLEY *et al.*, 2004).

Em 1972 pesquisadores relataram o primeiro TCTH bem-sucedido em um paciente com AA usando altas doses de CFA como condicionamento (THOMAS *et al.*, 1976). Posteriormente, relatos de RA sugeriram que a CFA em altas doses pode ser eficaz para o tratamento da AAS (BRODSKY; SENSENBRENNER; JONES *et al.*, 1996; DEZERN *et al.*, 2011).

Doses elevadas de CFA sem suporte de células-tronco podem induzir a remissão durável em uma doença autoimune como AAS (BRODSKY; SENSENBRENNER; JONES, 1996). Contudo, a maior toxicidade é a neutropenia prolongada e concomitante suscetibilidade às infecções, resultando em um aumento significativo do número de transfusões e maior tempo de internação e administração de antibióticos (TISDALE *et al.*, 2000; BRODSKY *et al.*, 2001; YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006).

O metabolismo da CFA é responsável por sua toxicidade contra o sistema imune sem danificar as células-tronco hematopoéticas. O principal mecanismo da desintoxicação da CFA parece ser a inativação de seus metabólitos pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (KOLLANDER; SLA, 2002). Células com alto potencial proliferativo, tal como as células-tronco hematopoéticas, são relativamente resistentes à CFA devido à expressão de altos níveis de ALDH (HILTON, 1984). Os linfócitos têm baixo nível de ALDH e são rapidamente destruídos por altas doses de CFA. Portanto, doses elevadas de CFA são altamente imunossupressoras, mas não mieloablativas, permitindo que as células-tronco hematopoéticas reconstituam a hematopoese (BRODSKY *et al.*, 2010).

O número de transfusões é a variável de maior importância no que se refere à sobrevida e à rejeição do enxerto após o TCTH. Inicialmente, no STMO-HC-UFPR os regimes de condicionamento se constituíam na administração de CFA 200 mg/kg de peso corpóreo dividida em quatro doses. Posteriormente, demonstrou-se que os pacientes que receberam mais de 15 transfusões prévias apresentaram maior índice de rejeição e conseqüentemente uma sobrevida mais baixa quando comparados àqueles que receberam menos transfusões. A partir de 1991 foi introduzido a esse grupo de pacientes a combinação de CFA 120 mg/kg de peso corpóreo dividido em duas doses e BUS 12 mg/kg de peso corpóreo dividido em 16 doses. Com essa associação houve redução acentuada do índice de rejeição (PASQUINI, 1991).

1.3.2.2 Complicações pós-transplante

As principais complicações referentes à morbidade e à mortalidade compreendem as infecções, a rejeição e a DECH.

A rejeição pode ocorrer precocemente, sendo designada como falha primária de pega, ou após a recuperação hematopoética, caracterizada como rejeição tardia. Pode-se reverter a rejeição tardia pela reintrodução da imunossupressão ou pelo retransplante. Tais medidas não se aplicam à rejeição precoce com o mesmo êxito (PASQUINI; BITENCOURT; MEDEIROS, 2013).

Um problema comum em pacientes politransfundidos é o desenvolvimento da aloimunização, gerando anticorpos anti-HLA contra as células do doador, o que pode resultar em um aumento do risco de rejeição do enxerto após o TCTH alogênico. Considerando-se que o tratamento de suporte fundamenta-se na reposição de plaquetas e hemácias e na prevenção e no controle das infecções, aconselha-se que os componentes sanguíneos sejam irradiados para prevenir a DECH associada à transfusão e filtrados para reduzir a incidência de infecção viral e prevenir a aloimunização (MARSH *et al.*, 2009; PASSWEG; MARSH, 2010; DEZERN; BRODSKY, 2011; PASQUINI; BITENCOURT; MEDEIROS, 2013).

Apesar das complicações que podem ocorrer, o TCTH alogênico com doador HLA compatível continua sendo a terapia mais apropriada para crianças e adultos jovens com AAS. Isso restaura a hematopoese em menos de quatro semanas e leva à cura da doença em mais de 80% dos casos (PASSWEG *et al.*, 1997; DEZERN; BRODSKY, 2011).

O resultado do transplante é avaliado por meio da recuperação hematológica e pela análise do quimerismo, a qual fornece informações sobre a recuperação hematopoética do paciente, que pode ser autóloga, alogênica ou quimérica.

1.4 ANÁLISE DE QUIMERISMO

O termo quimerismo deriva da palavra quimera, que na mitologia grega é utilizada para designar uma criatura que apresenta uma cabeça de leão, corpo de cabra e cauda de serpente (ROSE, 2005). Em medicina o termo quimera é usado para designar um indivíduo cujas células derivam de dois ou mais indivíduos geneticamente distintos. Esse evento pode ocorrer naturalmente por meio de transferência materno-fetal, transfusão de sangue ou após o TCTH (DEERLIN; WILLIAMS, 2007).

Com a evolução dos procedimentos adotados no TCTH, que incluem transplante não mieloablativo, depleção de linfócitos do doador e infusão de linfócitos do doador (DLI), tornou-se imprescindível detectar o grau exato do quimerismo em pacientes após o transplante. Isso auxilia na escolha da terapia a ser adotada para manter o enxerto, como também a induzir a remissão em pacientes com recaída da doença (KHAN; AGARWAL; AGRAWAL, 2004; LAWLER *et al.*, 2009).

1.4.1 Métodos de detecção do quimerismo

Análises moleculares de quimerismo são utilizadas para monitorar os níveis de células do doador e do receptor após o TCTH (BADER *et al.*, 2005). O princípio básico para detecção do quimerismo reside na habilidade de distinguir diferenças entre doador e receptor utilizando marcadores genéticos polimórficos ou seus produtos (KHAN; AGARWAL; AGRAWAL, 2004; KRISTT *et al.*, 2005). Muitos métodos têm sido desenvolvidos para análise de quimerismo, incluindo a fenotipagem de células vermelhas, tipagem HLA, polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e citogenética convencional. Esses métodos foram superados pela hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e por outros métodos moleculares mais informativos, sensíveis, robustos e rápidos. Alguns baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) utilizam marcadores com número variável de repetições em tandem (VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*) ou repetições curtas em tandem (STR - *Short Tandem Repeats*), e outros são fundamentados na PCR em Tempo Real (GIL; JEFFREYS; WERRETT, 1985; DURNAM *et al.*, 1989; WEBER; MAY, 1989; NAJFELD *et al.*, 1997; ALIZADEH *et al.*, 2002; BADER *et al.*, 2005; DEERLIN; WILLIAMS, 2007; KRISTT *et al.*, 2007).

A amplificação de marcadores VNTRs/STRs que se encontram dispersos por todo o genoma tornou-se, nos últimos anos, o método de escolha para determinação do estado de quimerismo. Os marcadores VNTRs/STRs consistem em sequências do DNA que são repetidas em número variável de vezes dentro de um loco genético. Os termos VNTR e STR se referem aos locos minissatélites e microsatélites, respectivamente, e são classificados de acordo com o número de pares de base das

sequências repetidas em tandem (DEBRAUWERE *et al.*, 1997; MOSSALLAM; SMITH; McFARLAND, 2005). Os locos VNTRs apresentam 8-80 pares de bases na unidade repetitiva, enquanto os locos STRs apresentam 2-7 pares de bases. Esses locos já foram identificados em diversas partes do genoma, e suas variantes alélicas, herdadas em cromossomos autossômicos por segregação mendeliana codominante, diferem quanto ao número de repetições presentes. As sequências repetitivas são flanqueadas por regiões conservadas que permitem a síntese de pares de *primers*, possibilitando a amplificação dos locos VNTRs/STRs pela PCR. A diferença entre os alelos é observada pela variação quanto ao tamanho dos fragmentos de amplificação gerados (GASPARINI *et al.*, 1989; DEERLIN; WILLIAMS, 2007).

A amplificação de marcadores VNTRs pela PCR apresenta a desvantagem da amplificação preferencial de fragmentos menores. Atualmente, o método padrão para testes de identificação humana reside na amplificação de marcadores STRs, por serem facilmente amplificados pela PCR sem apresentarem os problemas de amplificação preferencial. Isso é devido ao fato de os dois alelos serem semelhantes em tamanho no indivíduo heterozigoto, uma vez que o tamanho da repetição é pequeno. Um dos inconvenientes desse método é o aparecimento de bandas *stutter* que podem interferir na análise de quimerismo. Essas bandas são artefatos da PCR que surgem por deslizamento da enzima Taq polimerase durante o processo de amplificação *in vitro*. Tais artefatos são percebidos no eletroferograma como picos com uma unidade de repetição a menos que o alelo verdadeiro e compreendem de 5 a 10% da sua área (WALSH; FILDES; REYNOLDS, 1996; BUTLER, 2001; HASSAN; BONAMINO; RENAULT, 2009; MOSSALLAM; SMITH; McFARLAND, 2005).

O exame de análise de quimerismo é realizado em sangue periférico ou MO, com ou sem a separação das diferentes linhagens celulares. A sensibilidade do método escolhido apresenta impacto no resultado do quimerismo. Métodos que empregam marcadores VNTRs/STRs apresentam sensibilidade de 1 a 5%, porém quando utilizados em subpopulações celulares aumentam consideravelmente a sensibilidade para 0,1 a 0,001% (CHALANDON *et al.*, 2003; LION, 2003; SCHRAML *et al.*, 2003; LAMBA *et al.*, 2004; THIEDE; BORNHAUSER; EHNINGER, 2004; BADER *et al.*, 2005).

A análise dos marcadores VNTRs/STRs é realizada para o monitoramento de pacientes submetidos ao TCTH, para confirmar a identidade genética de gêmeos idênticos e para detectar células materno-fetais em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Combinada Severa (SMITH *et al.*, 2004).

1.4.2 Níveis de quimerismo

Vários termos são utilizados para descrever quimerismo pós-transplante. "Quimerismo completo" se refere à completa reconstituição hematopoética do paciente com células oriundas do doador. Em contraste, quando ambas as células do receptor e do doador estão presentes no compartimento medular do paciente, tem-se o "quimerismo misto". Ocorre "ausência de quimerismo" se somente as células do receptor estiverem presentes, indicando que houve uma recuperação autóloga da MO. O grau quimérico das frações celulares, como linfócitos T ou linfócitos B, é chamado de "quimerismo em subpopulação". É denominado "quimerismo de *split*" ou quimerismo seletivo quando ocorre a presença de quimerismo completo em uma ou mais frações celulares e quimerismo misto ou ausência de quimerismo em outra fração celular (ANTIN *et al.*, 2001; KHAN; AGARWAL; AGRAWAL, 2004; DEERLIN; WILLIAMS, 2007; OZYUREK *et al.*, 2008; GINEIKIENE; STOSKUS; GRISKEVICIUS, 2009).

Acreditava-se que uma hematopoese completa do doador seria essencial para manter a pega do enxerto após o TCTH alogênico. No entanto, nas últimas décadas, tornou-se evidente que as células do paciente e do doador podem coexistir no receptor após o transplante. Isso tem demonstrado que a evolução do quimerismo pós-transplante é um processo dinâmico. Sendo assim, pacientes com quimerismo completo no pós-transplante em um determinado período de tempo podem evoluir para quimerismo misto ou vice-versa. Em pacientes com quimerismo misto o grau de células autólogas pode aumentar ou diminuir. Esses pacientes são referidos como tendo quimerismo misto em elevação ou decréscimo (BADER *et al.*, 1996; LIESVELD; ROTHBERG, 2008; GINEIKIENE; STOSKUS; GRISKEVICIUS, 2009).

1.4.3 Recuperação hematopoética autóloga

Após o TCTH pode ocorrer uma recuperação hematopoética autóloga com normalização da contagem hematológica (HOELLE *et al.*, 2004). A RA foi inicialmente descrita por Thomas *et al.* (1976) e em seguida por Storb *et al.* (1987), que relataram longa sobrevida em um grupo de pacientes politransfundidos e submetidos a

um segundo TCTH devido à recaída da doença. Esses autores sugeriram que o segundo regime de condicionamento, utilizando CFA+GAT, pode ter aumentado a imunossupressão e favorecido a RA.

Nas doenças malignas ou não malignas, durante a fase de pega, recomenda-se a realização da análise de quimerismo em pequenos intervalos de tempo. Isso permite uma intervenção oportuna quando o *status* do quimerismo apresenta alterações (BADER *et al.*, 2005). A RA após o TCTH para pacientes portadores de AAS somente pode ser determinada se análises sequenciais de quimerismo forem realizadas (SPECK *et al.*, 1979; HINTERBERGER *et al.*, 1987; HOELLE *et al.*, 2004; LAWLER *et al.*, 2009).

1.4.4 Impacto do regime de condicionamento no quimerismo

O condicionamento mieloablativo comumente erradica as células hematopoéticas do paciente e resulta em um quimerismo completo do doador. A detecção de pequenas quantidades de quimerismo misto evidencia a presença de células remanescentes do receptor, que pode representar células normais ou malignas (DEERLIN; WILLIAMS, 2007; OZYUREK *et al.*, 2008). Regimes de condicionamento não mieloablativos têm sido cada vez mais utilizados em pacientes com doenças hematológicas, que não são considerados candidatos ao TCTH convencional, devido à idade ou aos fatores clínicos, e frequentemente resultam em quimerismo misto (BARON; SANDMAIER, 2006). Contudo, a ocorrência de quimerismo misto não significa necessariamente que ocorrerá rejeição do enxerto. O quimerismo pode evoluir tanto para uma recuperação alogênica quanto autóloga. Quando regimes de condicionamento menos intensos, como CFA isolada, são utilizados, a presença de células autólogas após o TCTH é esperada (HUSS *et al.*, 1996; LAWLER *et al.*, 2009).

Na maioria das doenças não malignas, tais como hemoglobinopatias, imunodeficiências e síndromes de falha medular, o quimerismo completo não é requerido para reversão ou cura da doença de base (ANTIN *et al.*, 2001).

Em pacientes com AAS o TCTH geralmente é realizado usando regime de condicionamento não mieloablativo, portanto o quimerismo misto é comumente

encontrado. Os níveis de quimerismo misto podem variar durante o tempo de acompanhamento sem qualquer intervenção específica (BADER *et al.*, 2005).

Enquanto regimes não mieloablativos têm sido associados à toxicidade reduzida em comparação com o regime de condicionamento mieloablativo convencional, a rejeição do enxerto, a DECH e a recaída da doença continuam sendo um problema significativo (LOUGHRAN; STORB, 1990; BARON; SANDMAIER, 2006).

1.4.5 Importância da análise de quimerismo na clínica

A interpretação da análise do quimerismo depende do tipo de TCTH realizado e da doença de base. Quimerismo pós-transplante é afetado pela quantidade de quimioterapia pré-transplante, intensidade do regime de condicionamento e conteúdo celular do enxerto (KHAN; AGARWAL; AGRAWAL, 2004; DEERLIN; WILLIAMS, 2007; TALWAR *et al.*, 2007).

A realização da análise de quimerismo pós-transplante pode auxiliar na identificação precoce do risco de rejeição do enxerto para pacientes com AAS, bem como para outras doenças malignas e não malignas, e revela interações imunológicas entre doador e receptor, fornecendo informações importantes para intervenções terapêuticas (LAWLER *et al.*, 2009).

Alguns autores utilizam os resultados do quimerismo como um guia para introdução da terapia com DLI (THIEDE *et al.*, 1999; DEERLIN; WILLIAMS, 2007; LION *et al.*, 2012). Como o quimerismo completo normalmente é necessário para controlar doenças malignas, a DLI é utilizada para conversão do quimerismo misto em quimerismo completo e para aumentar o efeito do enxerto *versus* leucemia (GARDINER *et al.*, 1998; SPITZER, 2000; BADER *et al.*, 2005). O quimerismo misto é relacionado com o aumento do risco de recaída em pacientes com leucemia aguda. O quimerismo com baixos níveis de células CD3+ e de células *Natural Killer* é correlacionado com aumento do risco de rejeição do enxerto. Todavia, a presença de quimerismo misto é associada com a diminuição da incidência da DECH (OZYUREK *et al.*, 2008).

Considerando-se que o principal objetivo do acompanhamento pós-transplante é prever eventos negativos, como a recaída da doença, rejeição do enxerto e a DECH, a análise de quimerismo tornou-se essencial para identificar e prever o sucesso ou a falha do TCTH (KHAN; AGARWAL; AGRAWAL, 2004; DEERLIN; WILLIAMS, 2007; TALWAR *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de quimerismo em pacientes com AAS adquirida, submetidos ao TCTH com doador aparentado precedidos de diferentes regimes de condicionamento, com mais de 18 meses de acompanhamento e que apresentavam recuperação hematológica parcial ou completa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar os níveis de quimerismo com os diferentes regimes de condicionamento.
- Correlacionar os diferentes níveis de quimerismo com as características do pré-transplante e do transplante, para identificar fatores que possam prever a evolução do enxerto alogênico de células-tronco hematopoéticas.
- Correlacionar os níveis de quimerismo com os níveis hematimétricos em sangue periférico após 18 meses do TCTH.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O STMO do HC da UFPR, implantado no ano de 1979, realizou 516 transplantes em pacientes portadores de AAS até outubro de 2011. Dos 516 pacientes 465 foram transplantados após a introdução da CSA (1986) na imunoprofilaxia pós-transplante, sendo que 432 transplantes foram realizados com doadores aparentados e 33 com doadores não aparentados. Dentre os aparentados, 191 pacientes foram condicionados com CFA isolada e a partir de 1992, devido à observação prévia de alto índice de rejeição em pacientes com mais de 15 transfusões, introduziu-se a combinação de CFA+BUS para tentar reduzir esta complicação. Cento e noventa e três pacientes foram condicionados com CFA associada ao BUS e 48 receberam outros condicionamentos. Dos 384 pacientes tratados com CFA isolada e CFA+BUS 119 foram a óbito e 265 permaneceram vivos. Destes, 171 pacientes realizaram a análise de quimerismo pós-TCTH com marcadores VNTRs/STRs, cuja implantação do exame data de 1995, sendo que 94 pacientes não apresentaram registro do exame no prontuário. Isso ocorreu devido ao fato que a análise de quimerismo com marcadores VNTRs/STRs ainda não havia sido implantada no Laboratório de Imunogenética. E também, em alguns casos, devido à indisponibilidade de amostra pré-transplante dos pacientes ou de amostra dos doadores ou ainda de amostra pós-transplante pelo não comparecimento dos pacientes às consultas de retorno. Dos 171 pacientes apenas 120 realizaram a análise de quimerismo com mais de 18 meses pós-transplante, sendo que 16 pacientes foram submetidos a um segundo transplante e excluídos do estudo.

Este é um estudo retrospectivo de 104 pacientes submetidos ao TCTH alogênico aparentado no STMO do HC-UFPR que foram acompanhados no período de agosto de 1987 a abril de 2012. Os critérios de inclusão foram: pacientes portadores de AAS submetidos ao TCTH com doador aparentado, que realizaram a análise de quimerismo com mais de 18 meses após o transplante, condicionados com ciclofosfamida isolada 200 mg/kg de peso corpóreo ou ciclofosfamida 120 mg/kg de peso corpóreo associada ao bussulfano 12 mg/kg de peso corpóreo e que tiveram recuperação hematológica parcial ou completa. Foram selecionados pacientes vivos, de ambos os sexos, de qualquer faixa etária e grupo étnico. Excluíram-se do estudo os pacientes que não realizaram a análise de quimerismo ou que o fizeram em data

inferior a 18 meses após o TCTH, que receberam condicionamento diferente daquele mencionado acima, que foram submetidos a um segundo transplante e que foram a óbito.

Os critérios para definição de AAS foram baseados nos estabelecidos por Camitta *et al.* (1979). Segundo esses autores, a doença é definida quando pelo menos dois dos seguintes achados estão presentes no sangue periférico e um na MO (Quadro 2).

SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
<ul style="list-style-type: none"> - neutrófilos abaixo de 500/μL - plaquetas abaixo de 20.000/μL - reticulócitos menor que 1% 	<ul style="list-style-type: none"> - intensamente hipocelular (menor que 25% da celularidade normal) - moderadamente hipocelular (25 a 50% da celularidade normal com menos de 30% de células hematopoéticas)

QUADRO 2 - CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA
 FONTE: Camitta *et al.* (1979)

Para realização da análise de quimerismo foram coletadas amostras de sangue periférico em EDTA ou células da mucosa bucal em solução salina para análise do padrão constitucional do paciente, que foram referidas como amostra pré-transplante. As amostras dos pacientes coletadas posteriormente ao transplante e as amostras dos respectivos doadores foram de sangue periférico em EDTA. O material biológico utilizado no estudo foi o DNA extraído das amostras coletadas, sendo que todo o procedimento técnico foi realizado no Laboratório de Imunogenética da Unidade de Apoio Diagnóstico do HC-UFPR.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, sob o Registro CEP: 65110 e CAAE: 05828212.4.0000.0096 (Anexo 1).

3.1 CARACTERÍSTICAS PRÉ-TRANSPLANTE, DO TRANSPLANTE E PÓS-TRANSPLANTE

3.1.1 Características pré-transplante

A idade mediana dos pacientes foi de 18 anos, variando entre um e 45 anos, sendo que apenas um paciente apresentou idade acima de 40 anos. Houve um predomínio do sexo masculino (71,2%).

Apenas 31,7% dos pacientes receberam imunossupressão prévia ao transplante.

O intervalo de tempo compreendido entre o diagnóstico e o TCTH variou entre menos de um mês até 127 meses com uma mediana de 3,0 meses. Na Tabela 1 são apresentadas as características pré-transplante.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS PRÉ-TRANSPLANTE

CARACTERÍSTICAS	N.º DE PACIENTES	MEDIANA (VARIAÇÃO)
Número de pacientes	104	
Idade (anos)		18,0 (1,0 - 45,0)
Sexo (M/F)	74/30	
Número de transfusões prévias:		17,5 (1,0 - 238)
<16	44 (42,3%)	
≥16 a 50	53 (51,0%)	
>50	7 (6,7%)	
Tratamento prévio:		
Nenhum	71 (68,3%)	
Prednisona (PDR)	13 (39,4%)	
CSA + PDR	11 (33,3%)	
Andrógeno + PDR	3 (9,1%)	
Outros	6 (18,2%)	
Intervalo entre o diagnóstico e o TMO (meses)		3,0 (0,0 - 127)

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC-UFPR

3.1.2 Características do transplante

Neste estudo, todos os pacientes avaliados receberam MO de doador irmão HLA compatível, sendo tipificados por métodos sorológico e (ou) moleculares de baixa/média e alta resoluções para identificar as proteínas HLA e (ou) variantes dos genes HLA, respectivamente.

O grau de compatibilidade das proteínas HLA de classes I e II dos pares paciente/doador transplantados até 1995 foi avaliado por meio dos testes de microlinfocitotoxicidade e cultura mista de linfócitos. Após essa data, métodos moleculares foram progressivamente sendo implantados, incluindo PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction - Sequence - Specific Primers*), PCR-SSO (*Polymerase Chain Reaction - Sequence-Specific Oligonucleotide Probes*) e SBT (*Sequence Based Typing*), que permitem a tipificação dos genes HLA, gerando resultados mais refinados e melhorando a informação sobre o grau de compatibilidade destes pares.

Os 104 pacientes incluídos no estudo compunham dois grupos de acordo com o regime de condicionamento recebido: 55 pacientes foram tratados com CFA isolada 200 mg/kg de peso corpóreo e 49 pacientes com CFA 120 mg/kg de peso corpóreo associada ao BUS 12 mg/kg de peso corpóreo. A utilização de diferentes regimes de condicionamento foi baseada no número de transfusões prévias. Pacientes que receberam menos que 16 transfusões foram tratados com CFA isolada e pacientes com 16 ou mais transfusões receberam CFA associada ao BUS. Apenas 11 pacientes que receberam 16 ou mais transfusões foram tratados com a CFA isolada, fato ocorrido anteriormente à implantação da combinação da CFA+BUS.

A idade mediana do doador foi de 18 anos, com variação desde menos de um mês até 48 anos, com discreto predomínio do sexo masculino (60,6%).

Apenas 20 pacientes apresentaram número de células infundidas inferior a $2,5 \times 10^8$ cel./kg de peso do receptor. As características do transplante encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DO TRANSPLANTE

CARACTERÍSTICAS	N.º DE PACIENTES	MEDIANA (VARIACÃO)
Condicionamento:		
CFA 200 mg/kg	55 (52,9%)	
CFA 120 mg/kg + BUS 12 mg/kg	49 (47,1%)	
Idade do doador (anos)		18,0 (0,0 - 48,0)
Sexo do doador (M/F)	63/41	
N.º de células infundidas ($\times 10^8$ cel./kg)		3,3 (1,0 - 9,0)
Imunoprofilaxia:		
Ciclosporina-A (CSA)	02	
Metotrexato (MTX) + CSA	102	

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC-UFPR

3.1.3 Características pós-transplante

Foram selecionados os últimos resultados da análise de quimerismo obtidos após 18 meses do TCTH, com a data da amostra pós-TMO variando de acordo com o seguimento clínico de cada paciente (M=55,5 meses). Cada grupo de condicionamento foi subdividido em níveis de quimerismo em relação às células do doador: $\leq 50\%$ doador, entre 51 e 90% doador e $>90\%$ doador. O Apêndice 1 apresenta dados sobre o número de transfusões, regime de condicionamento, data do TMO, data da amostra pós-TMO e resultado do quimerismo.

Foram coletados dados referentes ao número de neutrófilos, plaquetas e dosagem de hemoglobina do último hemograma disponível, sendo que a data deste exame variou de acordo com o seguimento clínico de cada paciente, mas sempre foi superior a 18 meses pós-TCTH (M=113 meses). Os Apêndices 2 a 4 apresentam dados sobre o regime de condicionamento, número de neutrófilos, dosagem de hemoglobina, número de plaquetas e resultado do quimerismo.

Os dados referentes às características pré-transplante, do transplante e pós-transplante em cada regime de condicionamento estão representados no Apêndice 5.

3.2 MÉTODOS

A análise de quimerismo pós-TCTH foi realizada por dois métodos diferentes de acordo com o período do transplante. Pacientes transplantados entre agosto de 1987 e julho de 2009 (84 pacientes) tiveram a análise realizada pela amplificação de locos VNTRs/STRs pela PCR, com detecção dos fragmentos amplificados em gel vertical e descontínuo de poliacrilamida e coloração com sais de prata.

Para a análise dos pacientes transplantados a partir de agosto de 2009 (20 pacientes), foi utilizada a amplificação de locos STRs pela PCR utilizando *primers* marcados com fluorescência, com detecção dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar em analisador genético de DNA.

3.2.1 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado a partir de células nucleadas de sangue periférico coletado em EDTA ou de células da mucosa bucal colhidas em solução salina. Para a extração do DNA, utilizou-se o método de *Salting Out* modificado, descrito por Miller, Dykes e Polesky (1988). Após a extração do DNA, as concentrações das amostras foram determinadas por meio da leitura da densidade ótica a 260nm e a pureza definida pela razão 260nm/280nm. Foram utilizadas amostras com pureza entre 1,65 - 1,80 na concentração de 12,5ng/uL para o método com detecção dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida e coloração com sais de prata, e concentração de 0,2ng/uL para o método com detecção dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar.

3.2.2 Amplificação dos locos VNTRs e STRs pela PCR com detecção dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida e coloração com sais de prata

3.2.2.1 Amplificação do DNA

Os locos VNTRs/STRs foram amplificados pela PCR, utilizando-se uma mistura de reação de acordo com o descrito por Smith e Mcfarland (1994). Analisaram-se os locos D1S80, SE33, HumTH01, 33.6, HumARA, e HumTPO cujas características estão descritas na Tabela 3. Os *primers* específicos para estes locos foram divididos em dois sistemas multiplex conforme descrito por Alonso *et al.* (1997) denominados de Triplex I e Triplex II. As amplificações foram realizadas em termocicladores ABI 9600 ou ABI 9700 (*Applied Biosystems Inc., USA*). O programa de amplificação foi composto de 28 ciclos, cada qual consistindo em 30 segundos a 94°C e 30 segundos a 62°C. Ao término desses ciclos as amostras foram submetidas a 62°C por 20 minutos com um ciclo final de 4°C *forever*.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS LOCOS VNTRs/STRs DOS TRIPLEX I E II

LOCOS	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	TAMANHO REPETIÇÃO	TAMANHO FRAGMENTOS	REFERÊNCIAS
D1S80	1p	16 pb	220-640 pb	Schwartz <i>et al.</i> (1995)
SE33	6q13	4 pb	234-318 pb	Leclair <i>et al.</i> (1995)
HumTH01	11q15.5	4 pb	179-203 pb	Schwartz <i>et al.</i> (1995)
33.6	1q	37 pb	500-1000 pb	Ugozzoli <i>et al.</i> (1991)
HumARA	Xcen-q13	3 pb	255-315 pb	Edwards <i>et al.</i> (1991)
HumTPO	2p23-2pter	4 pb	106-130 pb	Anker, Steinbrueck e Donis-Keller <i>et al.</i> (1992)

FONTE: O autor

3.2.2.2 Corrida eletroforética

Após a amplificação as amostras de DNA foram aplicadas em gel vertical e descontínuo de poliacrilamida conforme descrito por Sajantila e Lukka (1993). Neste procedimento foram utilizados dois géis, um inferior denominado gel de separação e um superior designado gel de alinhamento (*stacking gel*), ambos compostos de acrilamida e bisacrilamida em diferentes concentrações. A posição de migração dos fragmentos de DNA no gel é determinada pelo seu tamanho. A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical modelo Sigma-Aldrich a uma voltagem de 105 V por 18 horas à temperatura ambiente.

Os produtos amplificados foram visualizados por meio da coloração com sais de prata de acordo com o descrito por Smith e McFarland (1994).

3.2.2.3 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi baseada na comparação entre o padrão eletroforético apresentado pela amostra do paciente pós-transplante com o padrão da amostra do paciente pré-transplante e o padrão da amostra do doador (Figura 1). A proporção de células oriundas do doador foi expressa em porcentagem e inferida por meio da observação visual da espessura e intensidade das bandas eletroforéticas dos locos informativos.

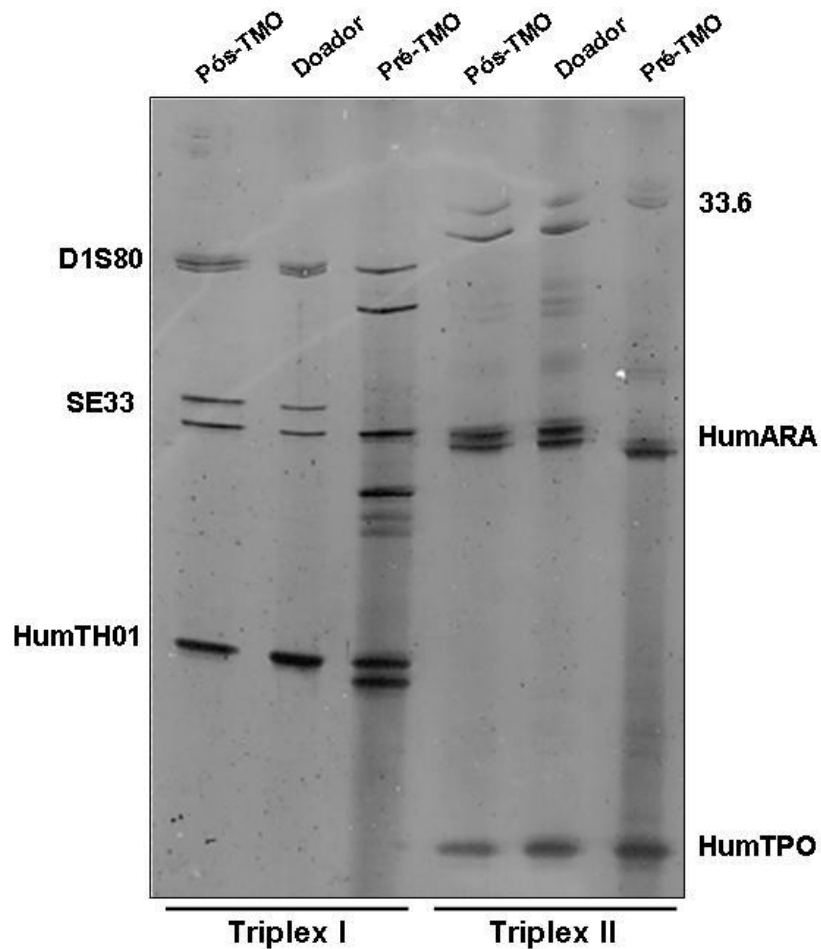


FIGURA 1 - DETECÇÃO DOS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES AOS ALELOS DO TRIPLEX I (LOCOS D1S80, SE33, HumTH01) E DO TRIPLEX II (LOCOS 33.6, HumARA, HumTPO) EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO COM SAIS DE PRATA

FONTE: Laboratório de Imunogenética da Unidade de Apoio Diagnóstico do HC-UFPR

NOTA: Pós-TMO = amostra do paciente posterior ao transplante. Doador = amostra do doador. Pré-TMO = amostra do paciente anterior ao transplante.

3.2.3 Amplificação dos locos STRs pela PCR utilizando *primers* marcados com fluorescência e detecção dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar

3.2.3.1 Amplificação do DNA

Utilizou-se um conjunto comercial próprio para uso em identificação humana (*AmpF ℓ STR Identifier - Applied Biosystems Inc., USA*) que permite a amplificação simultânea de quinze locos STRs, além do gene da Amelogenina: D8S1179, D21S11,

D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWa, TPOX, D18S51, D5S818 e FGA.

Estes locos são divididos em quatro conjuntos que exibem fragmentos de tamanhos diferentes e dentro de cada conjunto um *primer* de cada par é marcado com uma cor fluorescente distinta. Os quatro fluoróforos utilizados são 6-FAM, VIC, NED e PET. O quinto fluoróforo LIZ (*GeneScan-600 Size Standard*) possibilita determinar o tamanho dos fragmentos. Durante a PCR os fragmentos amplificados são marcados com as cores dos fluoróforos mencionados acima. As características dos marcadores foram descritas na Tabela 4.

A mistura de reação usada na amplificação foi preparada de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram amplificadas em termociclador *ABI 9700 (Applied Biosystems Inc., USA)*. O programa de amplificação foi composto de um tempo inicial de incubação de 11 minutos a 95°C e 28 ciclos, cada qual consistindo em 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 59°C e 60 segundos a 72°C. Ao término destes ciclos as amostras foram submetidas a 60° por 60 minutos com um ciclo final de 4°C *forever* (PARIS, 2006).

3.2.3.2 Corrida eletroforética

Após a amplificação as amostras foram desnaturadas e submetidas à eletroforese capilar em analisador genético de DNA modelo *ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., USA)*, conforme instruções do fabricante. Os produtos amplificados foram separados por tamanho de fragmentos e detectados por excitação dos fluoróforos por meio da incidência do laser. O fluoróforo 6-FAM emite fluorescência no menor comprimento de onda e é mostrado como azul seguido pelos fluoróforos VIC (verde), NED (amarelo), PET (vermelho) e LIZ (laranja) (PARIS, 2006).

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DOS LOCOS STR DO KIT *AMPFSTR IDENTIFILER*

LOCOS STR	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	SEQUÊNCIA REPETIDA	FLUORÓFORO	TAMANHO FRAGMENTO	DNA CONTROLE 9947A
D8S1179	8	TCTA	6-FAM	203-247 pb	13
D21S11	21q11-21q21	TCTA	6-FAM	203-259 pb	30
D7S820	7q11.21-22	GATA	6-FAM	215-247 pb	10,11
CSF1PO	5q33.3-34	AGAT	6-FAM	321-357 pb	10,12
D3S1358	3p	TCTA	VIC	115-147 pb	14,15
D13S317	13q22-q31	TATC	VIC	176-208 pb	11
D16S539	16q24-qter	GATA	VIC	264-304 pb	11,12
D2S1338	2q35-37.1	TGCC	VIC	291-359 pb	19,23
TH01	11P15.5	AATG	VIC	160-204 pb	8, 9,3
D19S433	19q12-13.1	AAGG	NED	92-150 pb	14,15
TPOX	2p23-2pter	AATG	NED	262-290 pb	8
VWA	12p12-pter	AGAT	NED	152-212 pb	17,18
D18S51	18q21.3	AGAA	NED	290-366 pb	15,19
Amelogenina	Xp22.1-22.3 Yp11.2	-	PET	106, 112 pb	X
D5S818	5q21-31	AGAT	PET	119-155 pb	11
FGA	4q28	TTTC	PET	322-444 pb	23,24

FONTE: Paris (2006)

3.2.3.3 Análise dos resultados

A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software GeneMapper* versão 4.0 (*Applied Biosystems Inc., USA*) que identifica os alelos STRs e fornece informações sobre a altura e área dos picos (Figura 2). A intensidade do sinal de fluorescência, indicada pela altura do pico, é proporcional à quantidade do produto da PCR. A comparação da altura do pico do fragmento de DNA entre alelos específicos do paciente e do doador permite avaliar a porcentagem de ambas as células presentes na amostra pós-transplante (SMITH *et al.*, 2004).

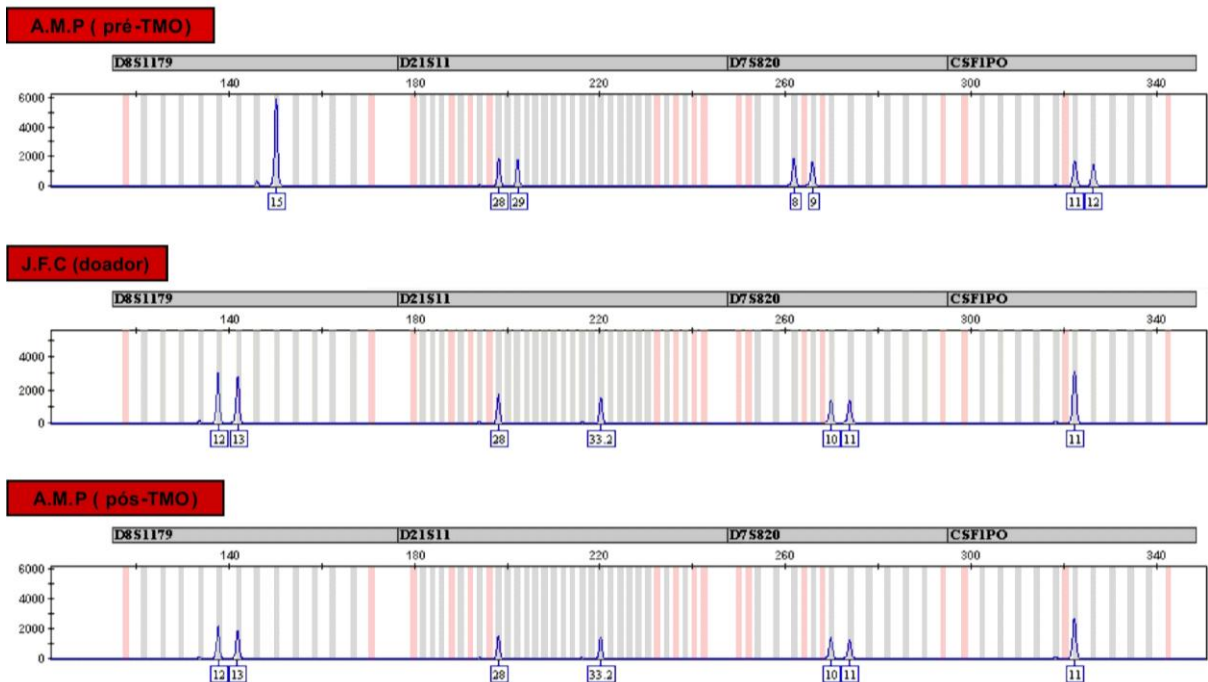


FIGURA 2 - DETECÇÃO DOS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES AOS ALELOS DOS LOCOS D8S1179, D21S11, D7S820 E CSF1PO POR ELETROFORESE CAPILAR EM ANALISADOR GENÉTICO DE DNA (ABI3130)

FONTE: Laboratório de Imunogenética da Unidade de Apoio Diagnóstico do HC-UFPR

NOTA: Pré-TMO = amostra do paciente anterior ao transplante. Doador = amostra do doador. Pós-TMO = amostra do paciente posterior ao transplante.

O cálculo da porcentagem de células procedentes do doador na amostra pós-TMO foi realizado por meio de uma planilha de Excel, elaborada com fórmulas específicas para este fim (SMITH *et al.*, 2004). O cálculo baseou-se na presença de picos homozigotos ou heterozigotos que apresentavam ou não um compartilhamento de alelos entre o paciente e o doador, conforme Figura 3 (THIEDE *et al.*, 1999; THIEDE; LION, 2001).

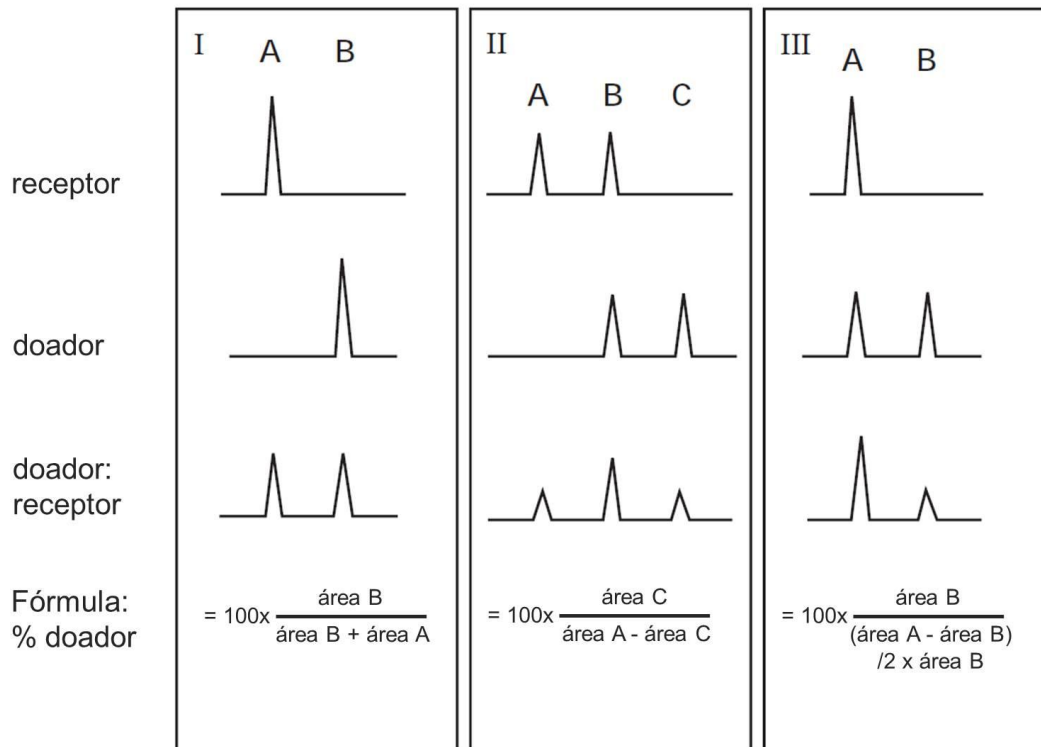


FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO QUIMERISMO

FONTE: Adaptado de Thiede *et al.* (1999)

NOTA: Cálculos utilizados nas seguintes situações: I = quando receptor e doador são homocigotos, mas apresentam alelos (picos) distintos. II = quando receptor e doador são heterocigotos e compartilham um alelo (pico). III = quando o receptor é homocigoto (um pico) e compartilha um dos alelos (picos) do doador heterocigoto.

3.2.4 Interpretação dos resultados e determinação do nível de quimerismo

Embora vários locos VNTRs/STRs sejam utilizados nos exames de análise de quimerismo pós-transplante aqueles cujos alelos são compartilhados pelo paciente e por seu doador resultam não informativos. Os locos que apresentam configurações alélicas distintas entre o paciente e o doador são considerados informativos e permitem identificar o nível de quimerismo em cada tempo investigado no pós-transplante (Quadro 3).

TIPO DE LOCO	PERFIL ELETROFORÉTICO
Loco informativo na regeneração autóloga	Amostras do paciente pré e pós-transplante apresentam o mesmo padrão eletroforético, o qual difere do padrão da amostra do doador. Indica que não foram detectadas células do doador na amostra pós-transplante do paciente.
Loco informativo na regeneração alogênica	Amostra do paciente pós-transplante e amostra do doador apresentam o mesmo padrão eletroforético, o qual difere do padrão da amostra pré-transplante do paciente. Indica que as células do paciente pós-transplante são procedentes do doador.
Loco informativo na regeneração quimérica	Amostra do paciente pós-transplante apresenta padrão eletroforético misto, ou seja, composto pelos padrões do doador e do paciente pré-transplante. Ocorre quando há a coexistência de células do doador e do paciente na amostra pós-transplante.
Loco parcialmente informativo	Amostra do doador apresenta-se em homozigose e o alelo em questão está presente na amostra pré-transplante do paciente ou vice-versa.
Loco não informativo	Ocorre quando a amostra pré-transplante do paciente e a amostra do doador possuem o mesmo perfil eletroforético, o que não permite avaliar a origem da regeneração do sistema hematopoético do paciente.

QUADRO 3- INTERPRETAÇÃO DO PADRÃO ELETROFORÉTICO DOS LOCOS VNTRs/STRs E DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE QUIMERISMO APÓS O TCTH

FONTE: Adaptado de Smith; McFarland (1994)

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das variáveis quantitativas foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para avaliação da associação entre os níveis de quimerismo e a variável qualitativa (sexo), foi utilizado o teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para a comparação de dois níveis de quimerismo em relação às variáveis quantitativas (idade, intervalo entre o diagnóstico e TMO, número de células infundidas, número de neutrófilos, dosagem de hemoglobina e número de plaquetas), foi usado o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Essas comparações em mais de dois níveis de quimerismo foi realizada considerando-se o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para avaliação conjunta das variáveis, ajustou-se um modelo de Regressão Logística incluindo-se as variáveis que apresentaram $p < 0,25$ na análise univariada (HOSMER; LEMESHOW, 2000). O teste de Wald foi usado para avaliar a significância das variáveis. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional *Statística v.8.0 (Stat Soft, Oklahoma, USA)*.

4 RESULTADOS

4.1 CONDICIONAMENTO E QUIMERISMO

Observou-se que no grupo de pacientes tratados com CFA isolada os achados do quimerismo foram >90% de células do doador em 24 pacientes (43,6%), entre 51 e 90% doador em 11 pacientes (20,0%) e ≤50% doador em 20 pacientes (36,4%). No grupo de pacientes que recebeu CFA associada ao BUS, 44 pacientes (89,8%) mostraram quimerismo >90% doador e 5 pacientes (10,2%) entre 51 e 90% doador. A análise estatística demonstra associação significativa entre regime de condicionamento e nível de quimerismo ($p<0,001$). O Gráfico 1 ilustra esses achados.

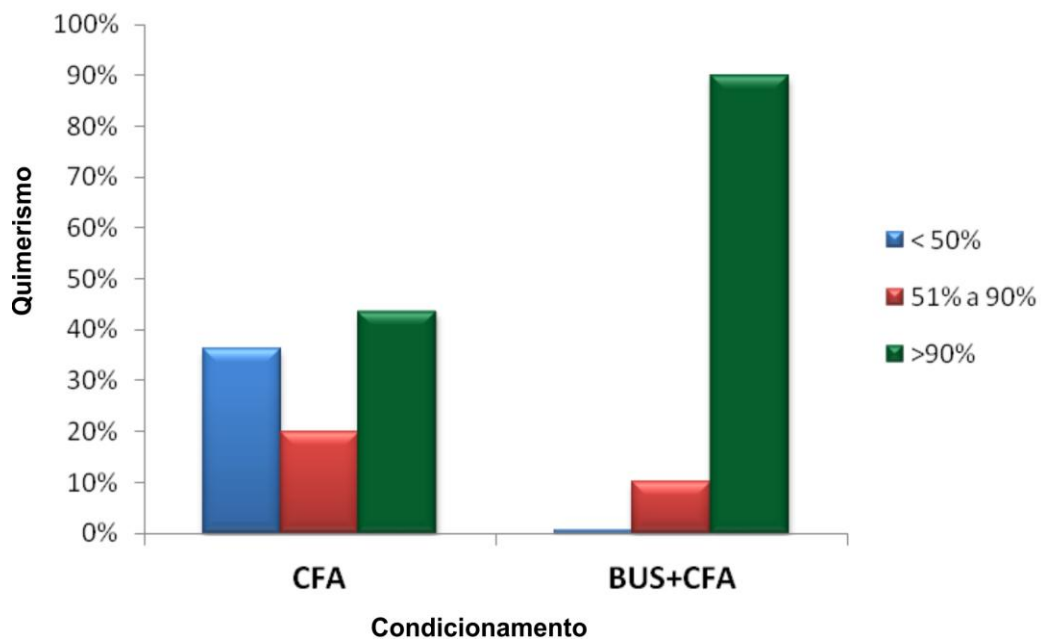


GRÁFICO 1 - ASSOCIAÇÃO ENTRE REGIME DE CONDICIONAMENTO E QUIMERISMO ($p<0,001$)
FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

4.2 CARACTERÍSTICAS PRÉ-TRANSPLANTE E QUIMERISMO

Foram comparadas as características pré-transplante dos pacientes em cada regime de condicionamento em relação aos níveis de quimerismo. As variáveis analisadas foram idade do paciente, sexo do paciente e intervalo entre o diagnóstico e o transplante.

4.2.1 Condicionamento com CFA isolada

As variáveis idade e sexo do paciente e intervalo entre o diagnóstico e o transplante não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação aos níveis de quimerismo, na análise univariada do grupo de pacientes tratados com CFA isolada. Estes dados encontram-se descritos nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 5 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS PRÉ-TRANSPLANTE (IDADE DO PACIENTE E INTERVALO ENTRE O DIAGNÓSTICO E O TCTH) NOS PACIENTES DO GRUPO DA CFA ISOLADA

VARIÁVEL	QUIMERISMO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
Idade do paciente (anos)	≤50%	20	15,0	16,5	1,0	30,0	8,1	0,241 ⁽¹⁾
	51% a 90%	11	16,5	14,0	5,0	35,0	7,8	
	>90%	24	19,5	20,0	5,0	34,0	9,8	
Intervalo entre diagnóstico e TCTH (meses)	≤50%	20	2,8	2,0	1,0	14,0	2,8	0,448 ⁽²⁾
	51% a 90%	11	5,8	2,0	1,0	36,0	10,2	
	>90%	24	3,4	2,5	0,0	14,0	2,9	

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

(1) ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

(2) Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

TABELA 6 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E SEXO DO PACIENTE NO GRUPO DA CFA ISOLADA

SEXO PACIENTE	QUIMERISMO		
	≤50%	51% a 90%	>90%
Masculino (n=40)	15 75,0%	8 72,7%	17 70,8%
Feminino (n=15)	5 25,0%	3 27,3%	7 29,2%
TOTAL	20	11	24

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

NOTAS: Teste de Qui-quadrado.

Valor de $p=0,953$.

4.2.2 Condicionamento com ciclofosfamida associada ao bussulfano

Nenhum fator pré-transplante teve influência no quimerismo na análise univariada do grupo de pacientes que receberam CFA associada ao BUS, porém o pequeno número de pacientes no nível de quimerismo entre 51 e 90% doador pode ser um fator limitante para uma conclusão definitiva. As variáveis analisadas (idade e sexo do paciente e intervalo entre o diagnóstico e o transplante) não apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação aos níveis de quimerismo entre 51 e 90% doador e >90% doador. Os dados analisados encontram-se descritos nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS PRÉ-TRANSPLANTE (IDADE DO PACIENTE E INTERVALO ENTRE O DIAGNÓSTICO E O TCTH) NOS PACIENTES DO GRUPO DA CFA+BUS

VARIÁVEL	QUIMERISMO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
Idade do paciente (anos)	51% a 90%	5	15,6	18,0	10,0	20,0	4,7	0,394 ⁽¹⁾
	>90%	44	19,3	18,0	6,0	45,0	9,4	
Intervalo entre diagnóstico e TCTH (meses)	51% a 90%	5	2,6	3,0	1,0	4,0	1,5	0,211 ⁽²⁾
	>90%	44	9,7	3,0	0,0	127,0	21,4	

FONTES: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

(1) Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$.

(2) Teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

TABELA 8 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E SEXO DO PACIENTE NO GRUPO DA CFA+BUS

SEXO PACIENTE	QUIMERISMO	
	51% a 90%	>90%
Masculino (n=34)	5 100,0%	29 65,9%
Feminino (n=15)	0 0,0%	15 34,1%
TOTAL	5	44

FONTES: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

NOTAS: Teste exato de Fisher.

Valor de $p=0,306$.

4.3 CARACTERÍSTICAS DO TRANSPLANTE E QUIMERISMO

Em cada regime de condicionamento foram analisadas as variáveis idade e sexo do doador e número de células infundidas em relação aos níveis de quimerismo.

4.3.1 Condicionamento com ciclofosfamida isolada

O número de células infundidas foi mais elevado nos pacientes com maior grau de quimerismo, diferindo com significância estatística entre os pacientes com quimerismo $\leq 50\%$ doador, entre 51 e 90% doador e $>90\%$ doador ($p=0,013$) na análise univariada do grupo condicionado com CFA isolada. As variáveis idade e sexo do doador não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao quimerismo (Tabelas 9 e 10).

TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS DO TRANSPLANTE (IDADE DO DOADOR E NÚMERO DE CÉLULAS INFUNDIDAS) NOS PACIENTES DO GRUPO DA **CFA ISOLADA**

VARIÁVEL	QUIMERISMO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
Idade do doador (anos)	$\leq 50\%$	20	18,3	17,0	6,0	48,0	10,7	0,518 ⁽¹⁾
	51% a 90%	11	16,1	17,0	1,0	28,0	9,1	
	$>90\%$	24	20,8	22,5	0,0	44,0	13,1	
Número de células infundidas ($\times 10^8$ cel./kg)	$\leq 50\%$	20	3,2	3,1	1,0	7,8	1,5	0,013 ⁽²⁾
	51% a 90%	11	3,7	3,7	2,5	5,9	1,0	
	$>90\%$	24	4,1	4,0	2,0	7,1	1,2	

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

(1) ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

(2) Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

TABELA 10 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E SEXO DO DOADOR NO GRUPO DA **CFA ISOLADA**

SEXO DOADOR	QUIMERISMO		
	$\leq 50\%$	51% a 90%	$>90\%$
Masculino (n=35)	12 60,0%	7 63,6%	16 66,7%
Feminino (n=20)	8 40,0%	4 36,4%	8 33,3%
TOTAL	20	11	24

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

NOTAS: Teste de Qui-quadrado.

Valor de $p=0,901$.

4.3.2 Condicionamento com ciclofosfamida associada ao bussulfano

A idade e sexo do doador e o número de células infundidas não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos pacientes com quimerismo entre 51 e 90% e >90% doador, na análise univariada do grupo de pacientes tratados com CFA associada ao BUS. Estes dados encontram-se descritos nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS DO TRANSPLANTE (IDADE DO DOADOR E NÚMERO DE CÉLULAS INFUNDIDAS) NOS PACIENTES DO GRUPO DA **CFA+BUS**

VARIÁVEL	QUIMERISMO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
Idade do doador (anos)	51% a 90%	5	14,4	13,0	10,0	20,0	4,4	0,219 ⁽¹⁾
	>90%	44	20,8	19,0	2,0	48,0	11,4	
Número de células Infundidas ($\times 10^8$ cel./kg)	51% a 90%	5	2,8	3,0	1,5	3,8	0,9	0,357 ⁽²⁾
	>90%	44	3,6	3,1	1,9	9,0	1,5	

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

(1) Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$.

(2) Teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

TABELA 12 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E SEXO DO DOADOR NO GRUPO DA **CFA+BUS**

SEXO DOADOR	QUIMERISMO	
	51% a 90%	>90%
Masculino (n=28)	3 60,0%	25 56,8%
Feminino (n=21)	2 40,0%	19 43,2%
TOTAL	5	44

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

NOTAS: Teste exato de Fisher.

Valor de $p=1$.

4.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

Previamente foram analisadas as variáveis do estudo pré-transplante e do transplante investigando a existência de associação com quimerismo >90% de células do doador. Para tanto, foram considerados os intervalos de quimerismo >90% ou <90% doador.

Na análise multivariada as variáveis incluídas foram: idade do paciente, idade do doador, intervalo entre o diagnóstico e o TCTH, regime de condicionamento e número de células infundidas. Para cada variável incluída no modelo testou-se a hipótese nula de inexistência de associação entre a variável e a probabilidade de quimerismo >90% doador *versus* a hipótese alternativa de existência de associação. Esta hipótese foi avaliada na presença das demais variáveis incluídas no modelo. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 13.

Os resultados da análise multivariada indicam uma tendência a que a idade mais elevada do paciente ($p=0,056$) esteja associada ao quimerismo >90% doador. O regime de condicionamento com CFA+BUS ($p<0,001$) e maior número de células infundidas ($p=0,009$) apresentam associação significativa com a probabilidade de quimerismo >90% doador.

TABELA 13 - ANÁLISE MULTIVARIADA

VARIÁVEIS	CLASSIFICAÇÃO	QUIMERISMO		VALOR DE $p^{(1)}$ (univariada)	VALOR DE $p^{(2)}$ (multivariada)	OR ⁽²⁾ IC (95%)
		≤ 90% (n=36) Mediana (variação)	>90% (n=68) Mediana (variação)			
Idade paciente (anos)		16,5 (1 - 35)	18,5 (5 - 45)	0,039	0,056	1,11 (1 - 1,23)
Idade doador (anos)		17 (1 - 48)	19,5 (0 - 48)	0,105	0,471	0,97 (0,9 - 1,05)
Intervalo entre diagnóstico e TCTH (meses)		2 (1 - 36)	3 (0 - 127)	0,125	0,861	1,01 (0,93 - 1,08)
Regime de condicionamento	CFA	31 (56,4%)	24 (43,6%)	<0,001	<0,001	16,68 (4,75 - 58,63)
	CFA + BUS	5 (10,2%)	44 (89,8)			
Número de células infundidas		3,17 (1,01-7,75)	3,37 (1,86- 8,96)	0,107	0,009	1,9 (1,17 - 3,1)

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

NOTA: IC = Intervalo de confiança; OR = *Odds Ratio*.

(1) Teste t de Student ou Teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p<0,05$.

(2) Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, $p<0,05$.

4.5 CARACTERÍSTICAS PÓS-TRANSPLANTE E QUIMERISMO

Em cada grupo de pacientes condicionados com CFA isolada e CFA associada ao BUS foram analisadas as variáveis número de neutrófilos, dosagem de

hemoglobina e contagem de plaquetas em relação aos níveis de quimerismo. A recuperação hematológica foi avaliada com base no último hemograma disponível, sendo que a data desse exame variou de acordo com o seguimento clínico de cada paciente, mas sempre foi superior a 18 meses pós-TCTH (M=113 meses).

4.5.1 Condicionamento com ciclofosfamida isolada

Pacientes com maior grau de quimerismo apresentaram número de neutrófilos e contagem de plaquetas mais elevados, diferindo com significância estatística entre os pacientes com quimerismo $\leq 50\%$ doador, entre 51 e 90% doador e $>90\%$ doador ($p=0,003$ e $p<0,001$, respectivamente), na análise univariada do grupo de pacientes tratados com CFA isolada. Para a variável hemoglobina não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de quimerismo. Os dados analisados encontram-se descritos na Tabela 14.

TABELA 14 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS PÓS-TRANSPLANTE (NÚMERO DE NEUTRÓFILOS, DOSAGEM DE HEMOGLOBINA E CONTAGEM DE PLAQUETAS APÓS 18 MESES DO TCTH) NO GRUPO DA **CFA ISOLADA**

VARIÁVEL	QUIMERISMO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
N.º de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$\leq 50\%$	20	2,5	2,2	1,0	5,9	1,3	0,003 ⁽²⁾
	51% a 90%	11	2,9	2,3	1,5	6,4	1,5	
	$>90\%$	24	3,9	3,3	2,3	8,2	1,6	
Hemoglobina (g/dL)	$\leq 50\%$	20	14,6	15,1	9,2	17,3	1,9	0,597 ⁽¹⁾
	51% a 90%	11	14,8	15,2	11,7	17,0	1,7	
	$>90\%$	24	15,1	15,1	13,3	19,2	1,3	
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$\leq 50\%$	20	143,2	143,5	12,0	249,0	65,9	$<0,001$ ⁽²⁾
	51% a 90%	11	169,5	163,0	23,0	251,0	65,9	
	$>90\%$	24	219,0	218,0	131,0	315,0	39,6	

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

(1) ANOVA com um fator, $p<0,05$.

(2) Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p<0,05$.

4.5.2 Condicionamento com ciclofosfamida associada ao bussulfano

Pacientes com quimerismo $>90\%$ doador apresentaram número de neutrófilos e plaquetas mais elevados comparados aos com quimerismo entre 51 e 90%

doador, mostrando uma tendência à significância estatística ($p=0,051$ e $p=0,051$), na análise univariada do grupo de pacientes condicionados com CFA+BUS. A variável hemoglobina não apresentou diferenças estatísticas entre os dois grupos. Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 15.

TABELA 15 - ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE QUIMERISMO E VARIÁVEIS PÓS-TRANSPLANTE (NÚMERO DE NEÚTRÓFILOS, DOSAGEM DE HEMOGLOBINA E CONTAGEM DE PLAQUETAS APÓS 18 MESES DO TCTH) NO GRUPO DA **CFA+BUS**

VARIÁVEL	QUIMERISMO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
N.º de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	51% a 90%	5	2,2	1,7	1,2	3,7	1,1	0,051 ⁽²⁾
	>90%	44	3,6	3,2	1,4	7,2	1,5	
Hemoglobina (g/dL)	51% a 90%	5	15,4	15,9	13,3	17,0	1,4	0,479 ⁽¹⁾
	>90%	44	14,9	14,7	8,8	17,6	1,8	
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	51% a 90%	5	149,2	158,0	73,0	182,0	44,8	0,051 ⁽²⁾
	>90%	44	206,7	216,5	41,0	361,0	66,7	

FONTE: Serviço de Transplante de Medula Óssea e Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR

(1) Teste t de Student para amostras independentes, $p<0,05$.

(2) Teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p<0,05$.

5 DISCUSSÃO

Na AA a contagem de todas as células sanguíneas é baixa, exigindo medidas terapêuticas urgentes a fim de se evitar a ocorrência de complicações fatais. O TCTH alogênico continua sendo a alternativa de cura mais adequada para pacientes com diagnóstico da doença, sendo capaz de reconstituir a hematopoese normal em poucas semanas (DEZERN; BRODSKY, 2011).

Após o TCTH, é essencial investigar a ocorrência de recuperação hematológica, bem como monitorar, por meio da análise de quimerismo, a origem das células que estão repovoando a MO, a fim de averiguar o sucesso ou a falha do procedimento. A avaliação clínica e a análise de quimerismo são utilizadas para estabelecer medidas terapêuticas a serem adotadas no pós-transplante (OZYUREK *et al.*, 2008; LAWLER *et al.*, 2009).

Com o advento da biologia molecular, testes mais sensíveis e específicos surgiram para a avaliação dos níveis de quimerismo. A amplificação de sequências repetitivas dispersas ao longo do genoma humano, empregando a PCR com a utilização de marcadores VNTRs e STRs, tem sido o método de escolha para definição destes níveis (HASSAN *et al.*, 2009).

Neste estudo retrospectivo de um grupo de pacientes com AAS, a análise de quimerismo foi realizada utilizando-se dois métodos diferentes: VNTR/STR-PCR semiquantitativo e STR-PCR fluorescente, que fornece uma quantificação mais precisa. Com o intuito de minimizar possíveis variações entre estes métodos, além de propor uma forma alternativa de abordagem, optou-se por adotar uma distribuição de resultados em níveis de quimerismo $\leq 50\%$ de células do doador, entre 51 e 90% doador e $>90\%$ doador. Os pacientes analisados foram submetidos ao condicionamento com CFA isolada ou CFA associada a BUS e acompanhados no pós-TCTH por mais de 18 meses, exibindo regeneração hematológica parcial ou completa.

A incidência de quimerismo misto varia na literatura e reflete tanto a sensibilidade do método utilizado quanto o tipo de condicionamento empregado. Em 1986, Hill *et al.* relataram a ocorrência de 58,3% de quimerismo misto em um grupo de pacientes com AAS condicionados com CFA e avaliados por análise citogenética. Já Casado *et al.* (1996), utilizando o método VNTR-PCR, observaram quimerismo misto em 29,4% dos pacientes submetidos ao condicionamento com CFA associado

à irradiação corporal. Vieira-Mion, no ano 2000, descreveu a ocorrência de 40,54% de recuperação quimérica em pacientes condicionados com CFA isolada e CFA+BUS, avaliados por meio de marcadores VNTRs/STRs-PCR. Alguns anos mais tarde, Hassan *et al.* (2004) relataram uma prevalência de 50% de quimerismo misto com a utilização de marcadores VNTRs/STRs em pacientes condicionados com CFA associada ou não ao GAT. McCann *et al.* (2007) verificaram, por meio de marcadores STRs-PCR, a presença de quimerismo misto em 51% dos pacientes tratados com CFA isolada e, no ano seguinte, Lawler *et al.* (2009) encontraram 56% de quimerismo misto, utilizando STR-PCR, em pacientes condicionados com CFA associada a outras drogas.

Neste estudo, os pacientes foram avaliados à luz de dois pontos específicos: associação dos níveis de quimerismo com os regimes de condicionamento e associação dos diferentes níveis de quimerismo com características do pré-transplante, do transplante e do pós-transplante.

Esta casuística difere da de muitos trabalhos publicados, o que dificulta a comparação dos dados. A literatura mostra poucas pesquisas sobre associação dos níveis de quimerismo em pacientes com AAS e regimes de condicionamento e nem todos os autores chegam às mesmas conclusões. Dentre as publicações, grande parte apresenta número amostral pequeno (WEITZEL *et al.*, 1988; KEABLE *et al.*, 1989; SOCIÉ *et al.*, 1992; CASADO *et al.*, 1996; HAMBLIN *et al.*, 1996; GOMEZ *et al.*, 1997; HASSAN *et al.*, 2004; MAO *et al.*, 2005), algumas fazem uma análise geral, não separando a AAS de outras doenças (HUSS *et al.*, 1996; LAWLER *et al.*, 2009), já em outras o quimerismo é avaliado por métodos pouco utilizados atualmente, como a citogenética convencional e a fenotipagem de células vermelhas (HILL *et al.*, 1986; KEABLE *et al.*, 1989) e nas demais os pacientes são condicionados com CFA associada a diferentes drogas ou em combinação com irradiação corporal (HUSS *et al.*, 1996; LAWLER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013).

No presente estudo, a análise dos regimes de condicionamento mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$) quanto aos níveis de quimerismo. Observou-se que 89,8% (44/49) dos pacientes tratados com CFA+BUS apresentaram quimerismo >90% doador, enquanto no grupo tratado com CFA isolada apenas 43,6% (24/55) dos pacientes foram incluídos na mesma faixa de quimerismo. Estes dados corroboram estudos anteriores que relatam a presença de maior porcentagem de células do doador em condicionamentos mieloablativos, como demonstrado também na análise multivariada desta casuística em que o condicionamento com

CFA+BUS mostrou-se associado ao quimerismo >90% doador (HOELLE *et al.*, 2004; OMMATI *et al.*, 2009).

A frequência de pacientes com quimerismo entre 51 e 90% doador foi duas vezes mais elevada no grupo condicionado com CFA isolada (20% - 11/55) quando comparada ao grupo submetido ao condicionamento com CFA+BUS (10,2% - 5/49). Tais achados assemelham-se aos de Gomez *et al.* (1997), Jillella *et al.* (2007), Padilha (2001) e Shamshad (2012), que indicam maior frequência de quimerismo misto em pacientes submetidos a condicionamentos não mieloablativos. Já Lawler *et al.* (2009) não encontraram forte associação entre diferentes regimes de condicionamento e grupos de quimerismo, embora um nível alto de quimerismo misto tenha sido observado no grupo de pacientes tratados com CFA+CAMPATH. Esses resultados podem ter sido influenciados pelo número pequeno de indivíduos pertencentes aos grupos que receberam CFA em combinação com outras drogas ou irradiação corporal.

Observando-se a evolução do quimerismo na população avaliada, verificou-se que pacientes com quimerismo $\leq 50\%$ doador tendem a demonstrar uma redução progressiva de células do doador e foram considerados como apresentando RA, dado o predomínio de células próprias. Dos 20 pacientes incluídos neste nível de quimerismo, apenas três apresentaram quimerismo misto (17%, 28% e 48% doador) e 17 pacientes mostraram ausência de quimerismo, sendo todos pertencentes ao grupo da CFA isolada. A RA foi encontrada em 36,4% (20/55) dos indivíduos que receberam CFA isolada, mas não foi observada naqueles condicionados com CFA+BUS. A frequência de RA encontrada neste estudo foi mais elevada quando comparada aos dados da literatura. Em 2010, numa pesquisa retrospectiva multicêntrica com portadores de AAS, Piccin *et al.* relataram uma incidência de 4,2% de pacientes com RA, o que pode ser explicada pelo uso de outros regimes de condicionamento e irradiação corporal. Pieroni *et al.* (2012) observaram 7% de RA em pacientes com AAS condicionados com CFA isolada ou CFA+GAT. Tal frequência de RA, inferior à do presente estudo, pode ser decorrente do emprego de métodos menos sensíveis para a determinação dos níveis de quimerismo, como a citogenética convencional e a fenotipagem de células vermelhas, embora os locos VNTRs tenham sido utilizados para alguns pacientes.

A ausência de RA no grupo condicionado com CFA+BUS corrobora trabalhos anteriores (GOMEZ *et al.*, 1997; JILLELLA *et al.*, 2007), e reforça o fato que o

condicionamento mieloablativo comumente erradica células do paciente e resulta em quimerismo completo do doador.

As características clínicas da casuística deste estudo assemelham-se às de alguns trabalhos (LOCATELLI *et al.*, 2000; McCANN *et al.*, 2007; LAWLER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013) no que se refere à idade mediana dos pacientes (M=18 anos), sexo (M=74/F=30) e tempo decorrido entre diagnóstico e início do tratamento (M=3 meses), mas diferem de outros em que o número de células infundidas é mais elevado (OMMATI *et al.*, 2009) e cujo tempo entre diagnóstico e TCTH é maior (DULLEY *et al.*, 2004).

Apenas 16 dos 104 pacientes incluídos nesta pesquisa foram a transplante no primeiro mês de diagnóstico em virtude da demora no encaminhamento deles ao STMO-HC-UFPR, especialmente nos anos anteriores a 1995. Vale notar que a partir dessa data houve maior divulgação das peculiaridades da AAS e melhorias no serviço de transplante, tanto no atendimento direto ao paciente quanto na agilidade e refinamento dos exames de histocompatibilidade para seleção de doadores de células-tronco hematopoéticas.

Em se tratando da associação entre os diferentes níveis de quimerismo e as características pré-transplante, a idade dos pacientes foi similar nos dois grupos de condicionamento e não apresentou associação estatisticamente significativa ($p=0,241$ para o grupo CFA isolada e $p=0,394$ para o grupo CFA+BUS). Estes achados assemelham-se aos de Lawler *et al.* (2009), que relataram ausência de correlação entre a idade e o *status* do quimerismo em pacientes tratados com CFA isolada e CFA associada a outras drogas. Na pesquisa de Piccin *et al.* (2010) foi observado que os pacientes com RA eram ligeiramente mais idosos que aqueles com pega estável do enxerto, no entanto a análise desses autores não considerou separadamente os diferentes tipos de condicionamento utilizados.

Apesar de outros estudos mostrarem que os resultados do transplante são melhores em idades mais baixas (BORTIN; GALE; RIMM, 1981; BRODSKY *et al.*, 2010; DEZERN; BRODSKY, 2011), a análise multivariada deste estudo demonstrou que a idade mais elevada do paciente apresenta uma tendência a associação com quimerismo >90% doador ($p=0,056$), sendo a mediana de idade dos pacientes de 18 anos. Este dado está de acordo com os resultados de Pasquini (1991), que identificou a idade mais baixa dos pacientes e as transfusões prévias como fatores de risco de rejeição.

No quesito gênero, não foi encontrada associação entre o sexo do paciente e os níveis de quimerismo nos regimes de condicionamento avaliados ($p=0,953$ para o grupo CFA isolada e $p=0,306$ para o grupo CFA+BUS), o que está de acordo com os achados de Lawler *et al.* (2009). Houve predominância de pacientes do sexo masculino, o que corrobora o estudo epidemiológico realizado por Maluf *et al.* (2002) no Estado do Paraná. Porém, difere do estudo realizado na Europa e Israel, onde a incidência da AAS é maior em mulheres (KAUFMAN *et al.*, 1996).

Os pacientes do grupo CFA+BUS apresentaram intervalo entre diagnóstico e TCTH ligeiramente maior ($M=3,0$ meses) do que o grupo tratado com CFA isolada ($M=2,0$ meses), o que pode ter tornado necessário maior número de transfusões prévias ao procedimento. A mediana do número de transfusões prévias ao transplante no grupo CFA+BUS foi 30 (variando de 16 a 238), enquanto no grupo CFA isolada foi 10 (variando de 1 a 60). Contudo, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre intervalo do diagnóstico e TCTH e níveis de quimerismo nos regimes de condicionamento avaliados ($p=0,448$ para o grupo CFA isolada e $p=0,211$ para o grupo CFA+BUS). Piccin *et al.* (2010) analisaram pacientes submetidos a diferentes regimes de condicionamento e verificaram que o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o transplante foi mais longo no grupo de RA em relação àquele de pega do enxerto estável.

Em relação às características do transplante, o maior número de células infundidas mostrou associação significativa com os níveis mais elevados de quimerismo ($p=0,013$) no grupo de pacientes condicionados com CFA isolada. Pacientes com menor número de células infundidas ($M=3,1 \times 10^8$ células/Kg de peso) apresentaram níveis de quimerismo $\leq 50\%$ doador. Estes índices confirmam dados da literatura que demonstram a influência do número de células no resultado do transplante (STORB; PRENTICE; THOMAS, 1977), sendo que a infusão de grande número de células diminui os riscos de rejeição (STORB; CHAMPLIN, 1991). Porém, a associação entre o número de células infundidas e os níveis de quimerismo não foi observada no grupo CFA+BUS. Esta ausência de associação pode ser decorrente do pequeno número de pacientes ($n=5$) com quimerismo entre 51 e 90% doador ou do próprio regime mieloablativo. Quimerismo $>90\%$ doador, na análise multivariada incluindo ambos os grupos de condicionamento, mostrou-se associado aos números mais elevados de células infundidas, demonstrando que a infusão de maior número de células permanece exercendo um papel importante na evolução do enxerto. Isso

indica que esse aspecto deve ser levado em conta e conduzir todos os esforços para se obter um número superior a $2,5 \times 10^8$ células/Kg de peso (GORIN *et al.*, 2003).

Outras características do transplante que mostraram não influir nos níveis de quimerismo são a idade do doador ($p=0,518$ para o grupo CFA e $p=0,219$ para o grupo CFA+BUS) e o sexo do doador ($p=0,901$ para o grupo da CFA e $p=1$ para o grupo da CFA+BUS). A mediana de idade dos doadores para ambos os regimes de condicionamento foi 18 anos, com predominância do sexo masculino. A pesquisa de Lawler *et al.* (2009) confirma os resultados deste estudo no que diz respeito à ausência de associação entre a idade do doador e o *status* do quimerismo.

A evolução pós-transplante dos pacientes foi acompanhada por meio da recuperação hematológica, com base no último hemograma disponível após 18 meses do TCTH. Comparando-se os dois regimes de condicionamento, observou-se número maior de neutrófilos e plaquetas nos níveis de quimerismo mais elevados, demonstrando associação significativa no grupo tratado com CFA isolada ($p=0,003$ e $p<0,001$, respectivamente) e tendência à significância no grupo que recebeu CFA+BUS ($p=0,051$ e $p=0,051$, respectivamente). Os níveis de hemoglobina verificados nos diferentes regimes de condicionamento não apresentaram associação ao quimerismo ($p=0,597$ para o grupo CFA isolada e $p=0,479$ para o grupo CFA+BUS). Considerando-se que o valor de referência de hemoglobina para os homens é mais elevado, os resultados deste estudo podem ter sido influenciados pela maior frequência de pacientes do sexo masculino (M=74/F=30) na população amostral. Na literatura, os dados em relação à recuperação hematológica se referem na sua maioria a períodos imediatamente após o transplante, não tendo sido encontrado trabalhos que relacionem parâmetros hematológicos e quimerismo em pacientes com mais de 18 meses após o transplante. Sendo assim, não foi possível submeter os dados desta pesquisa à comparação pela inexistência de estudos com as mesmas características do trabalho ora em apresentação.

A rejeição do enxerto pós-TCTH pode acontecer mesmo em pacientes acompanhados e monitorados clinicamente de forma extensiva. Dentre os fatores causais de rejeição incluem-se o número de transfusões prévias ao transplante e, conseqüentemente, a sensibilização do paciente a aloantígenos do doador (STORB *et al.*, 1983; PASQUINI, 1991). Pacientes conhecidamente sensibilizados devem ser submetidos a regimes de condicionamento mais potentes, como sugerem diferentes estudos (STORB; PRENTICE; THOMAS, 1977; DULLEY *et al.*, 2004).

O encaminhamento precoce de indivíduos com diagnóstico de AAS a centros de tratamento especializados é fundamental para reduzir o número de transfusões prévias; fator este que predispõe à rejeição e conduz à utilização de regimes de condicionamento mais agressivos. Sendo assim, é necessária a busca de novas estratégias de condicionamento para reduzir a rejeição, que apresentem menor toxicidade e não comprometam a sobrevida (PASQUINI, 1991). Após o transplante, informações sobre o *status* quimérico do paciente, em combinação a outros critérios, também podem auxiliar na intervenção terapêutica com o intuito de prevenir a rejeição do enxerto ou melhorar a qualidade da função hematopoética.

A demonstração de que o condicionamento empregando apenas CFA é capaz de induzir RA em pacientes com AAS reforça o emprego de imunossupressores no tratamento da doença, bem como incentiva a busca de novos agentes que possam regenerar a MO com maior eficácia e menor toxicidade. Na RA as maiores preocupações concentram-se na potencialidade de as células presentes serem suscetíveis à evolução clonal, podendo resultar em hemopatias malignas de difícil controle. Apesar disso, deve-se persistir na busca de novos agentes imunossupressores capazes de recuperar a hematopoese e permitir que complicações pós-transplante sejam evitadas, proporcionando uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Os dados obtidos a partir deste trabalho demonstram e enfatizam a experiência única do STMO-HC-UFPR, devido ao grande número de pacientes atendidos nesta instituição, referência no tratamento da AAS. Estudos como este podem contribuir para a elucidação da patogênese da doença e permitir, também, o desenvolvimento e a seleção de estratégias terapêuticas cada vez mais eficazes.

6 CONCLUSÕES

- Os níveis de quimerismo encontrados após 18 meses do transplante mostraram associação com o tipo de condicionamento utilizado (CFA isolada ou CFA associada ao BUS), sendo quimerismo >90% doador mais frequente nos pacientes condicionados com CFA+BUS.
- Quimerismo $\leq 50\%$ doador foi encontrado somente no grupo de pacientes que receberam CFA isolada e em nenhum dos pacientes que receberam a combinação CFA/BUS, reforçando que:
 - a recuperação autóloga da hematopoese depende da intensidade da imunossupressão exigida para cada caso; e
 - a função imunossupressora da CFA isolada pode induzir a regeneração hematológica autóloga.
- Quimerismo entre 51 e 90% doador foi observado em um número significativamente mais elevado de pacientes que receberam CFA isolada quando comparado aos que receberam CFA associada ao BUS. Este resultado demonstra que condicionamento não mieloablativo resulta em maior frequência de quimerismo misto.
- Quimerismo >90% doador foi mais frequente no grupo de pacientes que recebeu CFA associada ao BUS comparado ao grupo tratado com CFA isolada. Este dado indica que condicionamento mieloablativo favorece o quimerismo completo.
- As características pré-transplante (idade, sexo do paciente e intervalo entre o diagnóstico e o TMO) e do transplante (idade e sexo do doador) não mostraram influência nos níveis de quimerismo no grupo de pacientes condicionados com CFA isolada e no grupo condicionado com CFA associada ao BUS.
- O maior número de células infundidas mostrou associação com níveis de quimerismo mais elevados no grupo de pacientes tratados com CFA isolada e não apresentou associação no grupo que recebeu CFA associada ao BUS.

- O regime de condicionamento com CFA associada ao BUS e o maior número de células infundidas apresentam associação com níveis de quimerismo superiores a 90% doador na análise multivariada.
- A avaliação dos parâmetros hematológicos, após 18 meses do transplante, mostrou associação entre números mais elevados de neutrófilos e de plaquetas com níveis mais altos de quimerismo somente no grupo de pacientes condicionados com CFA isolada.
- A dosagem de hemoglobina não mostrou associação com o quimerismo tanto no grupo da CFA isolada como no grupo da CFA associada ao BUS.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592p.

ALIZADEH, M.; BERNARD, M.; DANIC, B.; DAURIAC, C.; BIREBENT, B.; LAPART, C.; LAMY, T.; LE PRISÉ, P. Y.; BEAUPLÉ, A.; BORIES, D.; SEMANA, G.; QUELVENEC, E. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. **Blood**, v.99, n.12, p.4618-4625, 2002.

ALONSO, C. A. M.; MALAGHINI, M.; PEREIRA, N. F.; RIBEIRO, E. M. S. F.; PASQUINI, R. Avaliação do quimerismo após o transplante de medula óssea (TMO) através da utilização de sistemas "triplex" de marcadores VNTR. **Revista Brasileira de Genética**, v.20, p.219, 1997.

ANKER, R.; STEINBRUECK, T.; DONIS-KELLER, H. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (Htpo) locus. **Human Molecular Genetics**, v.1, n.2, p.137, 1992.

ANTIN, J. H.; CHILDS, R.; FILIPOVICH, A. H.; GIRALT, S.; MACKINNON, S.; SPITZER, T.; WEISDORF, D. Establishment of Complete and Mixed Donor Chimerism After Allogeneic Lymphohematopoietic Transplantation : Recommendations From a Workshop at the 2001 Tandem Meetings. **Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v.7, n.9, p.473-485, 2001.

ARMAND, P.; ANTIN, J. H. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Aplastic Anemia. **American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v.516, p.505-516, 2007.

BACIGALUPO, A. Treatment strategies for patients with severe aplastic anemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.42 Suppl 1, p.S42-S44, 2008.

BACIGALUPO, A.; BALLEEN, K.; RIZZO, D.; GIRALT, S.; LAZARUS, H.; HO, V.; APPERLEY, J.; SLAVIN, S.; PASQUINI, M.; SANDMAIER, B. M.; BARRETT, J.; BLAISE, D.; LOWSKI, R.; HOROWITZ, M. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. **American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v.15, n.12, p.1628-1633, 2009.

BACIGALUPO, A.; BRAND, R.; ONETO, R.; BRUNO, B.; SOCIÉ, G.; PASSWEG, J.; LOCASCIULLI, A.; VAN LINT, M. T.; TICHELLI, A.; McCANN, S.; MARSH, J.; LJUNGMAN, P.; HOWS, J.; MARIN, P.; SCHREZENMEIER, H. Treatment of acquired severe aplastic anemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy--The European Group for Blood and Marrow Transplantation experience.

Seminars in Hematology, v.37, n.1, p.69-80, 2000.

BACIGALUPO, A.; HOWS, J.; GLUCKMAN, E.; NISSEN, C.; MARSH, J.; VAN LINT, M. T.; CONGIU, M.; DE PLANQUE, M. M.; ERNST, P.; McCANN, S.; *et al.* Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anaemia (SAA): a report of the EBMT SAA Working Party. **British Journal of Haematology**, v.70, n.2, p.177-182, 1988.

BADER, P.; HÖLLE, W.; KLINGEBIEL, T.; HANDGRETINGER, R.; NIETHAMMER, D.; BECK, J. Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. **Anticancer Research**, v.16, n.4A, p.1759-1763, 1996.

BADER, P.; NIETHAMMER, D.; WILLASCH, A.; KREYENBERG, H.; KLINGEBIEL, T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? **Bone Marrow Transplantation**, v.35, n.2, p.107-119, 2005.

BARON, F.; SANDMAIER, B. M. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. **Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v.20, n.10, p.1690-1700, 2006.

BITENCOURT, M. A. **O Tratamento da Anemia Aplástica Severa Adquirida com a combinação de ciclosporina e prednisona: Análise de 117 pacientes.** 60p. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

BORTIN, M. M.; GALE, R. P.; RIMM, A. A. Allogeneic bone marrow transplantation for 144 patients with severe aplastic anemia. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v.245, n.11, p.1132-1139, 1981.

BRODSKY, R. A.; CHEN, A. R.; DORR, D.; FUCHS, E. J.; HUFF, C. A.; LUZNIK, L.; SMITH, B. D.; MATSUI, W. H.; GOODMAN, S. N.; AMBINDER, R. F.; JONES, R. J. High-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia: long-term follow-up. **Blood**, v.115, n.11, p.2136-2141, 2010.

BRODSKY, R. A.; SENSENBRENNER, L. L.; JONES, R. J. Complete remission in severe aplastic anemia after high-dose cyclophosphamide without bone marrow transplantation. **Blood**, v.87, n.2, p.491-494, 1996.

BRODSKY, R. A.; SENSENBRENNER, L. L.; SMITH, B. D.; DORR, D.; SEAMAN, P. J.; LEE, S. M.; KARP, J. E.; BRODSKY, I.; JONES, R. J. Durable treatment-free remission after high-dose cyclophosphamide therapy for previously untreated severe aplastic anemia. **Annals of Internal Medicine**, v.135, n.7, p.477-483, 2001.

BUTLER, J. M. Biology of STRs: Stutter products, non-template addition, microvariants, null alleles, and mutation rates. In: _____. **Forensic DNA typing. Biology and technology behind STR markers**. London: Academic Press, 2001. p.81-98.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere maintenance and human bone marrow failure. **Blood**, v.111, n.9, p.4446-4455, 2008.

CAMITTA, B. M.; THOMAS, E. D.; NATHAN, D. G.; GALE, R. P.; KOPECKY, K. J.; RAPPEPORT, J. M.; SANTOS, G.; GORDON-SMITH, E. C.; STORB, R. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. **Blood**, v.53, n.3, p.504-514, 1979.

CASADO, L. F.; STEEGMANN, J. L.; PICÓ, M.; REQUENA, M. J.; RAMIREZ, M.; MADERO, L.; VICARIO, J. L.; ALEGRE, A.; GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ-RAÑADA, J. M. Study of chimerism in long-term survivors after bone marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.18, n.2, p.405-409, 1996.

CHALANDON, Y.; VISCHER, S.; HELG, C.; CHAPUIS, B.; ROOSNEK, E. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Geneva experience. **Leukemia**, v.17, n.1, p.228-231, 2003.

DEBRAUWERE, H.; GENDREL, C. G.; LECHAT, S.; DUTREIX, M. Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites. **Biochimie**, v.79, n.9-10, p.577-586, 1997.

DEERLIN, V. M. VAN; WILLIAMS, E. Assessment of Chimerism in the Setting of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. In: LEONARD, D.G.B. **Molecular pathology in clinical practice**. New York: Springer, 2007. p.517-531.

DEZERN, A. E.; BRODSKY, R. A. Clinical management of aplastic anemia. **Expert Review of Hematology**, v.90, n.2, p.221-230, 2011.

DEZERN, A. E.; PETRI, M.; DRACHMAN, D. B.; KERR, D.; HAMMOND, E. R.; KOWALSKI, J.; TSAI, H. L.; LOEB, D. M.; ANHALT, G.; WIGLEY, F.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. High-dose cyclophosphamide without stem cell rescue in 207 patients with aplastic anemia and other autoimmune diseases. **Medicine**, v.90, n.2, p.89-98, 2011.

DUFOUR, C.; DALLORSO, S.; CASARINO, L.; CORCIONE, A.; PISTOIA V.; BACIGALUPO, A.; MORREALE, G.; DINI, G. Late graft failure 8 years after first bone marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.23, n.7, p.743-745, 1999.

DULLEY, F. L.; VIGORITO, A C.; ARANHA, F. J. P.; STURARO, D.; RUIZ, M. A.; SABOYA, R.; MACEDO, M. C.; DA SILVA, R. L.; CHAMONE, D. A.; MEHTA, J.; BACIGALUPO, A.; DE SOUZA, C. A. Addition of low-dose busulfan to cyclophosphamide in aplastic anemia patients prior to allogeneic bone marrow transplantation to reduce rejection. **Bone Marrow Transplantation**, v.33, n.1, p.9-13, 2004.

DURNAM, D. M.; ANDERS, K. R.; FISHER, L.; O'QUIGLEY, J.; BRYANT, E. M.; THOMAS, E. D. Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. **Blood**, v.74, n.6, p.2220-2226, 1989.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A.; CASKEY, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, v.49, n.4, p.746-756, 1991.

FRICKHOFEN, N.; HEIMPEL, H.; KALTWASSER, J. P.; SCHREZENMEIER, H.; GERMAN APLASTIC ANEMIA STUDY GROUP. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. **Blood**, v.101, n.4, p.1236-1242, 2003.

GARDINER, N.; LAWLER, M.; O'RIORDAN, J. M.; DUGGAN, C.; DE ARCE, M.; McCANN, S. R. Monitoring of lineage-specific chimaerism allows early prediction of response following donor lymphocyte infusions for relapsed chronic myeloid leukaemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.21, n.7, p.711-719, 1998.

GASPARINI, P.; MARTINELLI, G.; TRABETTI, E.; AMBROSETTI, A.; BENEDETTI, F.; PIGNATTI, P. F. Bone marrow transplantation monitoring by DNA analysis. **Bone Marrow Transplantation**, v.4, p.157-159, 1989.

GEORGE, B.; MATHEWS, V.; VISWABANDYA, A.; KAVITHA, M. L.; SRIVASTAVA, A.; CHANDY, M. Fludarabine and cyclophosphamide based reduced intensity conditioning (RIC) regimens reduce rejection and improve outcome in Indian patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for severe aplastic anemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.40, n.1, p.13-18, 2007.

GILL, P.; JEFFREYS, A. J.; WERRETT, D. J. Forensic application of DNA 'fingerprints'. **Nature**, v.318, n.6046, p.577-579, 1985.

GINEIKIENE, E.; STOSKUS, M.; GRISKEVICIUS, L. Recent advances in quantitative chimerism analysis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.9, n.8, p.817-832, 2009.

GLUCKMAN, E.; HOROWITZ, M. M.; CHAMPLIN, R. E.; HOWS, J. M.; BACIGALUPO, A.; BIGGS, J. C.; CAMITTA, B. M.; GALE, R. P.; GORDON-SMITH, E. C.; MARMONT, A. M.; *et al.* Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: influence of conditioning and graft-versus-host disease prophylaxis regimens on outcome. **Blood**, v.79, n.1, p.269-275, 1992.

GOMEZ, J. R.; GARCIA, M. J.; SERRANO, J.; SANCHEZ, J.; FALCON, M.; CASTILLEJO, J. A.; NAVARRO, J. A.; MARTIN, C.; TORRES, A. Chimerism analysis in long-term survivor patients after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. **Haematologica**, v.82, n.5, p.588-591, 1997.

GORIN, N.C.; LABOPIN, M.; ROCHA, V.; ARCESE, W.; BEKSAC, M.; GLUCKMAN, E.; RINGDEN, O.; RUUTU, T.; REIFFERS, J.; BANDINI, G.; FALDA, M.; ZIKOS, P.; WILLEMZE, R.; FRASSONI, F. Marrow versus peripheral blood for geno-identical allogeneic stem cell transplantation in acute myelocytic leukemia: influence of dose and stem cell source shows better outcome with rich marrow. **Blood**, v.102, n.8, p.3043-3051, 2003.

HAMBLIN, M.; MARSH, J. C.; LAWLER, M.; McCANN, S. R.; WICKHAM, N.; DUNLOP, L.; BALL, S.; DAVIES, E. G.; HALE, G.; WALDMANN, H.; GORDON-SMITH, E. C. Campath-1G in vivo confers a low incidence of graft-versus-host disease associated with a high incidence of mixed chimaerism after bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia using HLA-identical sibling donors. **Bone Marrow Transplantation**, v.17, n.5, p.819-824, 1996.

HASSAN, R.; BONAMINO, M. H.; BRAGGIO, E.; LOBO, A. M.; SEUÁNEZ, H. N.; TABAK, D. G.; ZALCBERG, I. R. A systematic approach to molecular quantitative determination of mixed chimaerism following allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of its applicability in a group of patients with severe aplastic anaemia. **European Journal of Haematology**, v.73, n.3, p.156-161, 2004.

HASSAN, R.; BONAMINO, M. H.; RENAULT, I. Z. Monitoramento do Quimerismo Linfo-Hematopoético após Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. In: VOLTARELLI, J. C.; PASQUINI, R.; ORTEGA, E. T. T. (Ed.). **Transplante de células tronco hematopoéticas**. São Paulo: Atheneu, 2009. p.115-131.

HILL, R. S.; PETERSEN, F. B.; STORB, R.; APPELBAUM, F. R.; DONEY, K.; DAHLBERG, S.; RAMBERG, R.; THOMAS, E. D. Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. **Blood**, v.67, n.3, p.811-816, 1986.

HILTON, J. Role of Aldehyde Dehydrogenase in Role of Aldehyde Dehydrogenase in Cyclophosphamide-resistant L1210 Leukemia. **Cancer Research**, p.5156-5160, 1984.

HINTERBERGER, W.; GADNER, H.; HÖCKER, P.; HAJEK-ROSENMAYR, A.; GRANINGER, W.; GRABNER, G.; VOLC-PLATZER, B.; HAWLICZEK, R.; KÄRCHER, K. H.; KALLINGER, W.; *et al.* Survival and quality of life in 23 patients with severe aplastic anemia treated with bone marrow transplantation (BMT). **Blut**, v.54, n.3, p.137-146, 1987.

HOELLE, W.; BECK, J. F.; DUECKERS, G.; KREYENBERG, H.; LANG, P.; GRUHN, B.; FÜHRER, M.; NIETHAMMER, D.; KLINGEBIEL, T.; BADER, P. Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.33, n.2, p.219-223, 2004.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. 2.ed. USA: A Wiley Interscience Publication, 2000.

HUSS, R.; DEEG, H. J.; GOOLEY, T.; BRYANT, E.; LEISENRING, W.; CLIFT, R.; BUCKNER, C. D.; MARTIN, P.; STORB, R.; APPELBAUM, F. R. Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.18, n.4, p.767-776, 1996.

ISSARAGRISIL, S.; SRIRATANASATAVORN, C.; PIANKIJAGUM, A.; VANNASAENG, S.; PORAPAKKHAM, Y.; LEAVERTON, P. E.; KAUFMAN, D. W.; ANDERSON, T. E.; SHAPIRO, S.; YOUNG, N. S. Incidence of aplastic anemia in Bangkok. The Aplastic Anemia Study Group. **Blood**, v.77, n.10, p. 2166-2168, 1991.

JANDL, J. **Blood. Textbook of hematology**. Boston: Little Brown & Co, 1987. 1177p.

JILLELLA, A. P.; SHAFER, D.; KLUMPP, T. R.; EMMONS, R. V.; MANGAN, K. F. Mixed Chimerism and Graft Failure Following Conditioning With the Fludarabine and Cyclophosphamide Nonablative Regimen ; Conversion to Full Donor Chimerism. **American Journal of Hematology**, v.82, n.6, p.419-426, 2007.

KAUFMAN, D. W.; KELLY, J. P.; JURGELON, J. M.; ANDERSON, T.; ISSARAGRISIL, S.; WIHOLM, B. E.; YOUNG, N. S.; LEAVERTON, P.; LEVY, M.; SHAPIRO, S. Drugs in the aetiology of agranulocytosis and aplastic anaemia. **European Journal of Haematology**, v.60, p.23-30, 1996.

KEABLE, H.; BOURHIS, J. H.; BRISON, O.; LEHN, P.; SCHENMETZLER, C.; DEVERGIE, A.; GLUCKMAN, E. Long-term study of chimaerism in bone marrow transplantation recipients for severe aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v.71, n.4, p.525-533, 1989.

KEOHANE, E. M. Acquired aplastic anemia. **Clinical Laboratory Science: Journal of the American Society for Medical Technology**, v.17, n.3, p.165-71, 2004.

KHAN, F.; AGARWAL, A.; AGRAWAL, S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. **Bone Marrow Transplantation**, v.34, n.1, p.1-12, 2004.

KIM, H. J.; PARK, C. Y.; PARK, Y. H.; KIM, Y. J.; KIM, D. W.; MIN, W. S.; KIM, C. C. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using triple agent immunosuppression in severe aplastic anemia patients. **Bone Marrow Transplantation**, v.31, n.2, p.79-86, 2003.

KOLLANDER, Æ. R.; SLA, N. E. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer : a retrospective study. **Cancer**, p.309-321, 2002.

KRISTT, D.; ISRAELI, M.; NARINSKI, R.; OR, H.; YANIV, I.; STEIN, J.; KLEIN, T. Hematopoietic Chimerism Monitoring Based on STRs: Quantitative Platform Performance on Sequential Samples. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.16, n.4, p.380-391 2005.

KRISTT, D.; STEIN, J.; YANIV, I.; KLEIN, T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. **Bone Marrow Transplantation**, v.39, n.5, p.255-268, 2007.

LAMBA, R.; ABELLA, E.; KUKURUGA, D.; KLEIN, J.; SAVASAN, S.; ABIDI, M. H.; MOHAMED, A.; PERES, E. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. **Leukemia**, v.18, n.10, p.1681-1686, 2004.

LAWLER, M.; McCANN, S. R.; MARSH, C. W.; LJUNGMAN, P.; HOWS, J.; VANDENBERGHE, E.; O'RIORDAN, J.; LOCASCIULLI, A.; SOCIÉ, G.; KELLY, A.; SCHREZENMEIER, H.; MARIN, P.; TICHELLI, A.; PASSWEG, J. R.; DICKENSON, A.; RYAN, J.; BACIGALUPO, A. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA. **British Journal of Haematology**, v.144, n.6, p.933-945, 2009.

LECLAIR, B.; FREGEAU, C. J.; AYE, M. T.; FOURNEY, R. M. DNA typing for bone marrow engraftment follow-up after allogeneic transplant: a comparative study of current technologies. **Bone Marrow Transplantation**, v.16, n.1, p.43-55, 1995.

LIESVELD, J. L.; ROTHBERG, P. G. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? **Bone Marrow Transplantation**, v.42, n.5, p.297-310, 2008.

LION, T. Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. **Leukemia**, v.17, n.1, p.252-254, 2003.

LION, T.; WATZINGER, F.; PREUNER, S.; KREYENBERG, H.; TILANUS, M.; DE WEGER, R.; VAN LOON, J.; DE VRIES, L.; CAVÉ, H.; ACQUAVIVA, C.; LAWLER, M.; CRAMPE, M.; SERRA, A.; SAGLIO, B.; COLNAGHI, F.; BIONDI, A.; VAN DONGEN, J. J.; VAN DER BURG, M.; GONZALEZ, M.; ALCOCEBA, M.; BARBANY, G.; HERMANSON, M.; ROOSNEK, E.; STEWARD, C.; HARVEY, J.; FROMMLET, F.; BADER, P. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. **Leukemia**, v.26, n.8, p.1821-1828, 2012.

LOCASCIULLI, A.; ONETO, R.; BACIGALUPO, A.; SOCIÉ, G.; KORTHOF, E.; BEKASSY, A.; SCHREZENMEIER, H.; PASSWEG, J.; FÜHRER, M. 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. **Haematologica/The Hematology Journal**, v.92, n.1, p.11-18, 2007.

LOCATELLI, F.; BRUNO, B.; ZECCA, M.; VAN-LINT, M. T.; McCANN, S.; ARCESE, W.; DALLORSO, S.; DI BARTOLOMEO, P.; FAGIOLI, F.; LOCASCIULLI, A.; LAWLER, M.; BACIGALUPO, A. Cyclosporin A and short-term methotrexate versus cyclosporin A as graft versus host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia given allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling : results of a GITMO/EBMT randomiz. **Blood**, v.96, n.5, p.1690-1697, 2000.

LOUGHRAN, T. P.; STORB, R. Treatment of aplastic anemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.4, n.3, p.559-575, 1990.

MACIEJEWSKI, J. P.; RISITANO, A. M. Aplastic anemia: management of adult patients. **Hematology American Society of Hematology Educational Program**, p.110-117, 2005.

MALUF, E. M. C. P.; PASQUINI, R.; ELUF, J. N.; KELLY, J.; KAUFMAN, D. W. Aplastic anemia in Brazil: incidence and risk factors. **American Journal of Hematology**, v.71, n.4, p.268-274, 2002.

MAO, P.; ZHU, Z.; WANG, H.; WANG, S.; MO, W.; YING, Y.; LI, Q.; XU, Y. Sustained and stable hematopoietic donor-recipient mixed chimerism after unrelated cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. **European Journal of Haematology**, v.75, n.5, p.430-435, 2005.

MARSH, J. C. W.; BALL, S. E.; CAVENAGH, J.; DARBYSHIRE, P.; DOKAL, I.; GORDON-SMITH, E. C.; KEIDAN, J.; LAURIE, A.; MARTIN, A.; MERCIECA, J.; KILLICK, S. B.; STEWART, R.; YIN, J. A.; BRITISH COMMITTEE FOR STANDARDS IN HAEMATOLOGY. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v.147, n.1, p.43-70, 2009.

McCANN, S.; PASSWEG, J.; BACIGALUPO, A.; LOCASCIULLI, A.; LOCATELLI, F.; RYAN, J.; SCHREZENMEIER, H.; LAWLER, M. The influence of cyclosporin alone, or cyclosporin and methotrexate, on the incidence of mixed haematopoietic chimaerism following allogeneic sibling bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.39, n.2, p.109-114, 2007.

MEDEIROS, L. A. **Tratamento imunossupressor com ciclosporina e prednisona na anemia aplástica**: seguimento de 20 anos e estudo dos fatores preditores de resposta num centro de referência brasileira. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MILLER, S. A., DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.3, p.1215-1218, 1988.

MONTANÉ, E.; IBÁÑEZ, L.; VIDAL, X.; BALLARÍN, E.; PUIG, R.; GARCÍA, N.; LAPORTE, J. R.; CATALAN GROUP FOR STUDY OF AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANEMIA. Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study. **Haematologica**, v.93, n.4, p.518-523, 2008.

MOSSALLAM, G. I.; SMITH, A. G.; McFARLAND, C. Comparison of Variable Number Tandem Repeat and Short Tandem Repeat Genetic Markers for Qualitative and Quantitative Chimerism Analysis Post Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v.17, n.2, p.103-113, 2005.

NAJFELD, V.; BURNETT, W.; VLACHOS, A.; SCIGLIANO, E.; ISOLA, L.; FRUCHTMAN, S. Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes. **Bone Marrow Transplantation**, v.19, n.8, p.829-34, 1997.

NISSEN-DRUEY, C. Pathophysiology of aplastic anaemia. **Baillière's clinical haematology**, v.2, n.1, p.37-49, 1989.

OMMATI, L. V. M.; RODRIGUES, C. A.; SILVA, A R.; SILVA, L. P.; CHAUFAILLE, M. L.; OLIVEIRA, J. S. A retrospective comparison of cyclophosphamide plus antithymocyte globulin with cyclophosphamide plus busulfan as the conditioning regimen for severe aplastic anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, n.3, p.244-250, 2009.

OZYUREK, E.; COWAN, M. J.; KOERPER, M. A.; BAXTER-LOWE, L. A.; DVORAK, C. C.; HORN, B. N. Increasing mixed chimerism and the risk of graft loss in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant disorders. **Bone Marrow Transplantation**, v.42, n.2, p.83-91, 2008.

PADILHA, S. L. **Correlação do quimerismo e da rejeição com as variáveis relacionadas ao transplante de medula óssea alogênico na Anemia Aplástica Severa**. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

PARIS, ALESSANDRO. **AmpF ℓ STR Identifiler. PCR Amplification Kit. Tutorial**. São Paulo. 2006, 44 p. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com>>. Acesso em: 03/08/2009.

PASQUINI, R. **Transplante de medula óssea na Anemia Aplástica Severa: Estudo em 108 pacientes**. Concurso de Professor Titular. Departamento de Clínica Médica - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.

PASQUINI, R. Transplante de células-tronco hematopoéticas para as Anemias Aplásticas Adquiridas e Constitucionais. In: VOLTARELLI, J. C.; PASQUINI, R.; ORTEGA, E. T. T. (Ed.). **Hematologia fundamentos e prática**. 2009. São Paulo: Atheneu, 2009. p.234-257.

PASQUINI, R.; BITENCOURT, M. A.; MEDEIROS, L. A. Anemia Aplástica. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. (Eds.). **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p.95-102.

PASSWEG, J. R.; MARSH, J. C. W. Aplastic anemia: first-line treatment by immunosuppression and sibling marrow transplantation. **Hematology American Society of Hematology Education Program**, p.36-42, 2010.

PASSWEG, J. R.; SOCIÉ, G.; HINTERBERGER, W.; BACIGALUPO, A.; BIGGS, J. C.; CAMITTA, B. M.; CHAMPLIN, R. E.; GALE, R. P.; GLUCKMAN, E.; GORDON-SMITH, E. C.; HOWS, J. M.; KLEIN, J. P.; NUGENT, M. L.; PASQUINI, R.; ROWLINGS, P. A.; SPECK, B.; TICHELLI, A.; ZHANG, M. J.; HOROWITZ, M. M.; BORTIN, M. M. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: has outcome improved? **Blood**, v.90, n.2, p.858-864, 1997.

PEINEMANN, F.; GROUVEN, U.; KRÖGER, N.; BARTEL, C.; PITTLER, M. H.; LANGE, S. First-line matched related donor hematopoietic stem cell transplantation compared to immunosuppressive therapy in acquired severe aplastic anemia. **PloS One**, v.6, n.4, p.e18572, 2011.

PEREIRA, N. F.; PASQUINI, R. Antígenos de histocompatibilidade. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p.731-743.

PICCIN, A.; McCANN, S.; SOCIÉ, G.; ONETO, R.; BACIGALUPO, A.; LOCASCIULLI, A.; MARSH, J.; SCHREZENMEIER, H.; TICHELLI, A.; HAND, E.; LAWLER, M.; PASSWEG, J. Survival of patients with documented autologous recovery after SCT for severe aplastic anemia: a study by the WPSAA of the EBMT. **Bone Marrow Transplantation**, v.45, n.6, p.1008-1013, 2010.

PIERONI, F.; DIAS, J. B. E.; BARROS, G. M. N.; STRACIERI, A. B. P. L.; MORAES, D. A.; OLIVEIRA, M. C. B.; DARRIGO JUNIOR, L. G.; SIMÕES, B. P.; VOLTARELLI, J. C. **The incidence of autologous recovery and late graft failure in a Brazilian cohort of SAA transplanted patients**. Trabalho apresentado no 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Geneva, Switzerland, 2012.

ROSE, H. J. **A Handbook of greek mythology**. London and New York: Taylor & Francis Group, 2005.

ROSENFELD, S.; FOLLMANN, D.; NUNEZ, O.; YOUNG, N. S. Antithymocyte Globulin and Cyclosporine for Severe Aplastic Anemia. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v.289, n.9, p.1130, 2003.

SAJANTILA, A.; LUKKA, M. Improved separation of PCR amplified VNTR alleles by a vertical polyacrilamide gel electrophoresis. **International Journal of Legal Medicine**, v.105, p.355-359, 1993.

SANTOS, G. W. The development of busulfan/cyclophosphamide preparative regimens. **Seminars in Oncology**, v.20, n.4 Suppl 4, p.12-16; quiz 17, 1993.

SCHRAML, E.; DAXBERGER, H.; WATZINGER, F.; LION, T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Vienna experience. **Leukemia**, v.17, n.1, p.224-227, 2003.

SCHWARTZ, D. W. M.; GLOCK, B.; JUNGL, E.; MAYR, W. R. Strategy to detect chimerism in allogeneic bone marrow transplant recipients by PCR-amplification fragment length polymorphism analysis of microsatellite polymorphisms. **Vox Sanguinis**, v.68, n.2, p.139-143, 1995.

SELLERI, C.; SATO, T.; ANDERSON, S.; YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. P. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha suppress both early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. **Journal of Cellular Physiology**, v.165, n.3, p.538-546, 1995.

SHAMSHAD, G. U.; AHMED, S.; BHATTI, F. A.; ALI, N. Mixed donor chimerism in non-malignant haematological diseases after allogeneic bone marrow transplantation. **Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan: JCPSP**, v.22, n.12, p.765-768, 2012.

SLOAND, E.; KIM, S.; MACIEJEWSKI, J. P.; TISDALE, J.; FOLLMANN, D.; YOUNG, N. S. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. **Blood**, v.100, n.4, p.1185-1191, 2002.

SMITH, A. G.; McFARLAND, C. Chimerism analysis procedure. **Clinical Immunogenetics Laboratories Fred Hutchinson Cancer Research Center**. Seattle, 1994. 30p.

SMITH, A. G.; McFARLAND, C.; CARLSON, T.; *et al.* Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. **Clinical Immunogenetics Laboratory Fred Hutchinson Cancer Research Center**. Seattle, 2004. 49p.

SOCIÉ, G.; LANDMAN, J.; GLUCKMAN, E.; DEVERGIE, A.; RAYNAL, B.; ESPEROU-BOURDEAU, H.; BRISON, O. Short-term study of chimaerism after bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v.80, n.3, p.391-398, 1992.

SOCIÉ, G.; ROSENFELD, S.; FRICKHOFEN, N.; GLUCKMAN, E.; TICHELLI, A. Late clonal diseases of treated aplastic anemia. **Seminars in Hematology**, v.37, n.1, p.91-101, 2000.

SPECK, B.; SARTORIUS, J.; CORNU, P.; NISSEN, C.; WEBER, W.; GRATWOHL, A. [Bone marrow transplantation in severe aplastic anemia and acute leukemia]. **Onkologie**, v.2, n.2, p.79-82, 1979.

SPITZER, T. R. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant strategies and the role of mixed chimerism. **The Oncologist**, v.5, n.3, p.215-223, 2000.

STORB, R.; CHAMPLIN, R. E. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.8, n.2, p.69-72, 1991.

STORB, R.; PRENTICE, R. L.; THOMAS, E. D. Marrow transplantation for treatment of aplastic anemia. An analysis of factors associated with graft rejection. **The New England Journal of Medicine**, v.296, n.2, p.61-66, 1977.

STORB, R.; PRENTICE, R. L.; THOMAS, E. D.; APPELBAUM, F. R.; DEEG, H. J.; DONEY, K.; FEFER, A.; GOODELL, B. W.; MICKELSON, E.; STEWART, P. *et al.* Factors associated with graft rejection after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v.55, n.4, p.573-585, 1983.

STORB, R.; WEIDEN, P. L.; SULLIVAN, K. M.; APPELBAUM, F. R.; BEATTY, P.; BUCKNER, C. D.; CLIFT, R. A.; DONEY, K. C.; HANSEN, J.; MARTIN, P. J. *et al.* Second marrow transplants in patients with aplastic anemia rejecting the first graft: use of a conditioning regimen including cyclophosphamide and antithymocyte globulin. **Blood**, v.70, n.1, p.116-121, 1987.

TALWAR, S.; KHAN, F.; NITYANAND, S.; AGRAWAL, S. Chimerism monitoring following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v.39, n.9, p.529-535, 2007.

THIEDE, C.; BORNHÄUSER, M.; EHNINGER, G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. **Leukemia**, v.18, n.2, p.248-254, 2004.

THIEDE, C.; FLOREK, M.; BORNHÄUSER, M.; RITTER, M.; MOHR, B.; BRENDEL, C.; EHNINGER, G.; NEUBAUER, A. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. **Bone Marrow Transplantation**, v.23, n.10, p.1055-1060, 1999.

THIEDE, C.; LION, T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. **Leukemia**, v.15, p.303-306, 2001.

THOMAS, E. D.; STORB, R.; GIBLETT, E. R.; LONGPRE, B.; WEIDEN, P. L.; FEFER, A.; WITHERSPOON, R.; CLIFT, R. A.; BUCKNER, C. D. Recovery from aplastic anemia following attempted marrow transplantation. **Experimental Hematology**, v.4, n.2, p.97-102, 1976.

TISDALE, J. F.; DUNN, D. E.; GELLER, N.; PLANTE, M.; NUNEZ, O.; DUNBAR, C. E.; BARRETT, A. J.; WALSH, T. J.; ROSENFELD, S. J.; YOUNG, N. S. High-dose cyclophosphamide in severe aplastic anaemia: a randomised trial. **Lancet**, v.356, n.9241, p.1554-1559, 2000.

TONG, J.; BACIGALUPO, A.; PIAGGIO, G.; FIGARI, O.; SOGNO, G.; MARMONT, A. In vitro response of T cells from aplastic anemia patients to antilymphocyte globulin and phytohemagglutinin: colony-stimulating activity and lymphokine production. **Experimental Hematology**, v.19, n.5, p.312-316, 1991.

UGOZZOLI, L.; YAM, P.; PETZ, L. D.; FERRARA, G. B.; CHAMPLIN, R. E.; FORMAN, S. J.; KOYAL, D.; WALLACE, R. B. Amplification by polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. **Blood**, v.77, n.7, p.1607-1615, 1991.

VIEIRA-MION, A. L. **Avaliação, através da análise de regiões hipervariáveis do genoma humano, da recuperação autóloga, alogênica ou quimérica em pacientes com anemia aplástica severa submetidos ao transplante de medula óssea.** 108f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

VOLTARELLI, J. C.; STRACIERI, A. B. P. L. Aspectos imunológicos dos transplantes de células tronco-hematopoéticas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.33, p.443-462, 2000.

WALSH, P. S.; FILDES, N. J.; REYNOLDS, R. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. **Nucleic Acids Research**, v.24, n.14, p.2807-2812, 1996.

WANG, H.; WANG, Z.; ZHENG, X.; DING, L.; ZHU, L.; YAN, H.; GUO, Z. Hematopoietic stem cell transplantation with umbilical cord multipotent stromal cell infusion for the treatment of aplastic anemia--a single-center experience. **Cytotherapy**, v.15, n.9, p.1118-1125, 2013.

WEBER, J.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.388-396, 1989.

WEITZEL, J. N.; HOWS, J. M.; JEFFREYS, A. J.; MIN, G. L.; GOLDMAN, J. M. Use of a hypervariable minisatellite DNA probe (33.15) for evaluating engraftment two or more years after bone marrow transplantation for aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v.70, n.1, p.91-97, 1988.

WINTROBE, M. M.; LEE, G. R. **Clinical hematology**. 9.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993.

YOUNG, N. S. Acquired aplastic anemia. **Annals of Internal Medicine**, v.136, n.7, p.534-546, 2002.

YOUNG, N. S.; ALTER, B. P. **Aplastic anemia acquired and inherited**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. 616p.

YOUNG, N. S.; CALADO, R. T.; SCHEINBERG, P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. **Blood**, v.108, n.8, p.2509-2519, 2006.

YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. **The New England Journal of Medicine**, v.336, n.19, p.1365-1372, 1997.

ZHAO, Z.; PAN, X.; LIU, L.; LIU, N. Telomere Length Maintenance, Shortening, and Lengthening. **Journal of Cellular Physiology**, 2013.

APÊNDICES

**APÊNDICE 1 - NÚMERO DE TRANSFUSÕES, TIPO DE CONDICIONAMENTO,
DATA DO TMO, DATA DA AMOSTRA PÓS-TMO E RESULTADO DO QUIMERISMO**

continua

PACIENTES	TRANSFUSÕES	CONDICIONAMENTO	DATA DO TMO	DATA AMOSTRA PÓS-TMO	RESULTADO QUIMERISMO
01	<16 transfusões	CFA	27/03/00	11/11/02	0%
02	<16 transfusões	CFA	22/04/98	31/05/01	0%
03	<16 transfusões	CFA	26/04/04	19/01/07	0%
04	<16 transfusões	CFA	08/01/03	15/03/07	0%
05	<16 transfusões	CFA	20/03/01	22/10/03	0%
06	<16 transfusões	CFA	13/09/96	13/03/02	0%
07	<16 transfusões	CFA	13/03/07	22/09/08	0%
08	<16 transfusões	CFA	27/02/97	06/10/09	17%
09	<16 transfusões	CFA	04/07/96	13/09/99	0%
10	<16 transfusões	CFA	25/08/93	17/01/01	0%
11	<16 transfusões	CFA	20/12/96	02/09/09	0%
12	<16 transfusões	CFA	16/11/93	22/06/99	48%
13	<16 transfusões	CFA	25/11/02	27/06/05	0%
14	<16 transfusões	CFA	10/03/98	28/09/00	0%
15	<16 transfusões	CFA	22/09/97	05/01/00	0%
16	≥16 transfusões	CFA	11/07/96	22/06/98	28%
17	≥16 transfusões	CFA	02/01/92	16/07/04	0%
18	≥16 transfusões	CFA	29/01/90	24/09/97	0%
19	≥16 transfusões	CFA	16/08/89	11/12/96	0%
20	≥16 transfusões	CFA	26/09/96	02/03/07	0%
21	<16 transfusões	CFA	07/02/08	20/01/11	73%
22	<16 transfusões	CFA	31/01/01	17/02/09	90%
23	<16 transfusões	CFA	26/03/97	19/05/04	80%
24	<16 transfusões	CFA	28/05/96	19/04/11	68%
25	<16 transfusões	CFA	26/02/03	23/04/09	85%
26	<16 transfusões	CFA	10/10/06	16/09/10	87%
27	<16 transfusões	CFA	14/04/93	17/03/03	68%
28	<16 transfusões	CFA	27/05/98	21/07/10	82%
29	<16 transfusões	CFA	27/03/95	14/11/00	83%
30	<16 transfusões	CFA	27/08/01	13/05/04	85%
31	<16 transfusões	CFA	30/08/01	13/01/04	100%
32	<16 transfusões	CFA	12/11/90	19/02/97	93%
33	<16 transfusões	CFA	02/06/04	04/04/08	100%
34	<16 transfusões	CFA	07/08/06	8/12/09	100%
35	<16 transfusões	CFA	06/08/01	26/05/10	93%
36	<16 transfusões	CFA	09/03/00	04/07/07	95%
37	<16 transfusões	CFA	02/03/90	04/08/05	100%
38	<16 transfusões	CFA	09/11/04	30/07/09	100%
39	<16 transfusões	CFA	16/12/91	23/11/98	100%
40	<16 transfusões	CFA	25/06/07	05/01/10	100%
41	<16 transfusões	CFA	25/02/03	24/04/08	100%
42	<16 transfusões	CFA	18/08/87	03/08/00	100%
43	<16 transfusões	CFA	24/04/98	26/11/01	100%
44	<16 transfusões	CFA	21/07/09	26/04/11	91%
45	<16 transfusões	CFA	05/11/91	22/10/02	100%
46	<16 transfusões	CFA	11/08/98	29/03/01	95%
47	<16 transfusões	CFA	04/10/04	06/05/09	93%
48	<16 transfusões	CFA	10/09/92	04/12/98	100%
49	<16 transfusões	CFA	23/09/87	08/01/99	100%

conclusão

PACIENTES	TRANSFUSÕES	CONDICIONAMENTO	DATA DO TMO	DATA AMOSTRA PÓS-TMO	RESULTADO QUIMERISMO
50	≥16 transfusões	CFA	30/04/92	29/06/06	90%
51	≥16 transfusões	CFA	26/08/87	13/02/97	100%
52	≥16 transfusões	CFA	27/10/08	23/09/10	100%
53	≥16 transfusões	CFA	29/08/91	07/08/97	93%
54	≥16 transfusões	CFA	24/01/89	01/07/97	93%
55	≥16 transfusões	CFA	26/12/91	09/10/98	100%
56	≥16 transfusões	BUS+CFA	11/10/01	09/09/03	85%
57	≥16 transfusões	BUS+CFA	23/12/03	16/08/05	85%
58	≥16 transfusões	BUS+CFA	28/03/02	12/07/07	85%
59	≥16 transfusões	BUS+CFA	27/01/95	22/01/09	83%
60	≥16 transfusões	BUS+CFA	22/05/98	24/04/00	83%
61	≥16 transfusões	BUS+CFA	17/05/96	29/10/08	100%
62	≥16 transfusões	BUS+CFA	08/04/04	18/06/08	100%
63	≥16 transfusões	BUS+CFA	24/06/04	16/11/09	100%
64	≥16 transfusões	BUS+CFA	04/09/96	06/05/08	100%
65	≥16 transfusões	BUS+CFA	28/05/97	02/08/00	100%
66	≥16 transfusões	BUS+CFA	08/04/93	02/09/97	100%
67	≥16 transfusões	BUS+CFA	03/12/93	17/05/04	100%
68	≥16 transfusões	BUS+CFA	23/11/04	30/10/06	95%
69	≥16 transfusões	BUS+CFA	01/07/94	26/06/96	100%
70	≥16 transfusões	BUS+CFA	14/10/99	07/02/07	100%
71	≥16 transfusões	BUS+CFA	20/12/94	26/03/99	100%
72	≥16 transfusões	BUS+CFA	19/09/01	21/02/08	100%
73	≥16 transfusões	BUS+CFA	01/09/97	28/07/08	100%
74	≥16 transfusões	BUS+CFA	15/10/07	09/02/10	100%
75	≥16 transfusões	BUS+CFA	18/05/99	09/01/01	100%
76	≥16 transfusões	BUS+CFA	02/07/99	10/05/05	100%
77	≥16 transfusões	BUS+CFA	26/10/99	19/07/07	100%
78	≥16 transfusões	BUS+CFA	26/05/95	13/02/97	100%
79	≥16 transfusões	BUS+CFA	18/01/08	22/02/10	100%
80	≥16 transfusões	BUS+CFA	28/01/93	26/03/03	100%
81	≥16 transfusões	BUS+CFA	05/09/95	10/10/97	100%
82	≥16 transfusões	BUS+CFA	17/05/02	17/02/04	100%
83	≥16 transfusões	BUS+CFA	18/11/99	10/07/08	100%
84	≥16 transfusões	BUS+CFA	22/09/08	26/10/10	100%
85	≥16 transfusões	BUS+CFA	08/02/96	31/07/08	93%
86	≥16 transfusões	BUS+CFA	04/04/94	10/09/96	100%
87	≥16 transfusões	BUS+CFA	24/07/08	03/03/11	100%
88	≥16 transfusões	BUS+CFA	10/03/00	30/01/02	93%
89	≥16 transfusões	BUS+CFA	09/09/04	25/03/09	100%
90	≥16 transfusões	BUS+CFA	12/05/04	07/12/09	100%
91	≥16 transfusões	BUS+CFA	05/11/01	20/10/03	100%
92	≥16 transfusões	BUS+CFA	20/09/01	18/07/08	100%
93	≥16 transfusões	BUS+CFA	04/09/00	12/07/02	100%
94	≥16 transfusões	BUS+CFA	17/03/08	29/07/10	97%
95	≥16 transfusões	BUS+CFA	15/02/00	09/05/05	100%
96	≥16 transfusões	BUS+CFA	23/01/07	08/04/09	100%
97	≥16 transfusões	BUS+CFA	05/05/99	17/04/01	100%
98	≥16 transfusões	BUS+CFA	13/02/02	12/03/09	100%
99	≥16 transfusões	BUS+CFA	27/08/04	25/06/09	100%
100	≥16 transfusões	BUS+CFA	30/01/97	04/04/00	100%
101	≥16 transfusões	BUS+CFA	30/11/98	04/04/01	100%
102	≥16 transfusões	BUS+CFA	16/05/05	23/01/07	100%
103	≥16 transfusões	BUS+CFA	05/06/97	19/08/99	100%
104	≥16 transfusões	BUS+CFA	26/01/09	13/08/10	100%

**APÊNDICE 2 - PACIENTES COM QUIMERISMO ≤50% DOADOR
(CONDICIONAMENTO, NÚMERO DE NEUTRÓFILOS, HEMOGLOBINA, NÚMERO
DE PLAQUETAS E RESULTADO DO QUIMERISMO)**

PACIENTES	CONDICIONAMENTO	N.º NEUTRÓFILO (10 ³ /μL)	Hb (g/dL)	N.º PLAQUETAS (10 ³ /μL)	RESULTADO QUIMERISMO
1	CFA	2,812	15,0	139	0%
2	CFA	3,773	16,5	176	0%
3	CFA	0,97	15,6	65	0%
4	CFA	2,305	13,7	191	0%
5	CFA	3,61	14,3	200	0%
6	CFA	0,957	11,6	59	0%
7	CFA	1,983	15,8	142	0%
8	CFA	1,394	15,5	135	17%
9	CFA	2,194	17,3	149	0%
10	CFA	2,043	13,7	249	0%
11	CFA	1,283	15,1	184	0%
12	CFA	2,017	15,1	183	48%
13	CFA	5,852	13,7	233	0%
14	CFA	1,944	14,8	94	0%
15	CFA	4,7	13,8	145	0%
16	CFA	1,344	9,2	12	28%
17	CFA	3,265	15,5	22	0%
18	CFA	3,498	15,3	218	0%
19	CFA	2,435	17,0	133	0%
20	CFA	2,917	12,9	135	0%

**APÊNDICE 3 - PACIENTES COM QUIMERISMO ENTRE 51 E 90% DOADOR
(CONDICIONAMENTO, NÚMERO DE NEUTRÓFILOS, HEMOGLOBINA, NÚMERO
DE PLAQUETAS E RESULTADO DO QUIMERISMO)**

PACIENTES	CONDICIONAMENTO	N.º NEUTRÓFILO (10 ³ /µL)	Hb (g/dL)	N.º PLAQUETAS (10 ³ /µL)	RESULTADO QUIMERISMO
1	CFA	2,246	11,7	195	73%
2	CFA	1,491	16,5	124	90%
3	CFA	2,316	14,8	146	80%
4	CFA	1,060	11	98	68%
5	CFA	2,456	15,2	142	85%
6	CFA	6,380	13,7	238	87%
7	CFA	3,172	15,3	163	68%
8	CFA	1,950	14,6	184	82%
9	CFA	1,989	15,2	151	83%
10	CFA	4,653	17,0	251	85%
11	CFA	1,679	16,7	247	90%
12	BUS+CFA	3,661	16,1	158	85%
13	BUS+CFA	1,67	17	182	85%
14	BUS+CFA	3,147	14,8	182	85%
15	BUS+CFA	1,195	13,3	73	83%
16	BUS+CFA	1,5	15,9	151	83%

**APÊNDICE 4 - PACIENTES COM QUIMERISMO >90% DOADOR
(CONDICIONAMENTO, NÚMERO DE NEUTRÓFILOS, HEMOGLOBINA, NÚMERO
DE PLAQUETAS E RESULTADO DO QUIMERISMO)**

continua

PACIENTES	CONDICIONAMENTO	N.º NEUTRÓFILO (10 ³ /µL)	Hb (g/dL)	N.º PLAQUETAS (10 ³ /µL)	RESULTADO QUIMERISMO
1	CFA	4,087	14,8	261	100%
2	CFA	4,651	15,6	207	93%
3	CFA	3,033	15,9	131	100%
4	CFA	5,312	14,2	180	100%
5	CFA	2,917	13,8	208	93%
6	CFA	4,279	16,5	218	95%
7	CFA	8,204	13,3	274	100%
8	CFA	2,615	14,6	206	100%
9	CFA	5,4	16,5	227	100%
10	CFA	2,294	14,8	272	100%
11	CFA	3,403	15,9	177	100%
12	CFA	4,956	15,9	224	100%
13	CFA	3,162	14	201	100%
14	CFA	2,546	14,2	315	91%
15	CFA	2,933	15,4	178	100%
16	CFA	3,213	15,8	163	95%
17	CFA	3,414	15,6	217	93%
18	CFA	2,623	15,7	230	100%
19	CFA	5,88	14	225	100%
20	CFA	3,075	13,3	218	100%
21	CFA	2,516	13,5	203	100%
22	CFA	2,796	16,0	252	93%
23	CFA	3,381	14,0	219	93%
24	CFA	7,814	19,2	251	100%
25	BUS+CFA	2,952	15,2	168	100%
26	BUS+CFA	2,91	17,1	157	100%
27	BUS+CFA	1,404	14,3	126	100%
28	BUS+CFA	1,929	17,5	160	100%
29	BUS+CFA	5,518	16,8	313	100%
30	BUS+CFA	5,36	8,8	132	100%
31	BUS+CFA	4,473	12,4	41	100%
32	BUS+CFA	1,981	12,2	361	95%
33	BUS+CFA	7,15	14,1	316	100%
34	BUS+CFA	1,685	17,2	147	100%
35	BUS+CFA	2,604	12,5	313	100%
36	BUS+CFA	4,289	13,7	257	100%
37	BUS+CFA	5,463	14,2	261	100%
38	BUS+CFA	4,02	17	250	100%
39	BUS+CFA	2,204	14,7	241	100%
40	BUS+CFA	2,262	17,6	243	100%
41	BUS+CFA	2,763	14,5	204	100%
42	BUS+CFA	2,759	14,1	218	100%
43	BUS+CFA	2,073	14,6	215	100%
44	BUS+CFA	1,843	14,4	203	100%
45	BUS+CFA	3,696	16,5	201	100%
46	BUS+CFA	6,232	15,8	237	100%
47	BUS+CFA	2,964	16,7	223	100%

conclusão

PACIENTES	CONDICIONAMENTO	N.º NEUTRÓFILO (10 ³ /μL)	Hb (g/dL)	N.º PLAQUETAS (10 ³ /μL)	RESULTADO QUIMERISMO
48	BUS+CFA	5,401	15,5	224	100%
49	BUS+CFA	3,129	15,4	177	93%
50	BUS+CFA	3,888	17,1	258	100%
51	BUS+CFA	2,474	15,7	116	100%
52	BUS+CFA	4,467	13,7	223	93%
53	BUS+CFA	3,187	16,5	240	100%
54	BUS+CFA	3,848	17,6	263	100%
55	BUS+CFA	4,091	13,5	210	100%
56	BUS+CFA	5,062	13,0	220	100%
57	BUS+CFA	4,144	16,4	177	100%
58	BUS+CFA	2,371	15,7	101	97%
59	BUS+CFA	2,784	13,6	148	100%
60	BUS+CFA	3,66	12,5	270	100%
61	BUS+CFA	5,985	13,3	148	100%
62	BUS+CFA	2,558	16,1	208	100%
63	BUS+CFA	2,414	15,4	249	100%
64	BUS+CFA	1,457	14,4	50	100%
65	BUS+CFA	5,779	13,9	219	100%
66	BUS+CFA	2,605	13,4	247	100%
67	BUS+CFA	5,664	16,8	180	100%
68	BUS+CFA	3,552	14	199	100%

APÊNDICE 5 - CARACTERÍSTICAS PRÉ-TRANSPLANTE, DO TRANSPLANTE E PÓS-TRANSPLANTE NO GRUPO DA CFA ISOLADA E CFA ASSOCIADA AO BUSSULFANO

VARIÁVEIS	CFA ISOLADA Mediana (variação)	CFA+BUS Mediana (variação)
Idade do paciente (anos)	M=17 (1 - 35)	M=18 (6 - 45)
Sexo do paciente	Masc.= 40 Fem.=15	Masc.=34 Fem.=15
Intervalo entre diagnóstico e TCTH (meses)	M=2 (0 - 36)	M=3 (0 - 127)
Idade do doador (anos)	M=18 (0 - 48)	M=18 (2 - 48)
Sexo do doador	Masc.=35 Fem.=20	Masc.=28 Fem.=21
N.º de células infundidas ($\times 10^8$ cel./kg)	M=3,3 (1,0 - 7,8)	M=3,1 (1,5 - 9,0)
N.º de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	M=2,9 (1,0 - 8,2)	M=3,2 (1,2 - 7,2)
Hemoglobina (g/dL)	M=15,1 (9,2 - 19,2)	M=14,8 (8,8 - 17,6)
Contagem de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	M=191 (12 - 315)	M=208 (41 - 361)

**ANEXO - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HC-UFPR**

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HCUFPR

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DO QUIMERISMO EM PACIENTES COM ANEMIA APLÁSTICA SEVERA APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS, SUBMETIDOS A DIFERENTES REGIMES DE CONDICIONAMENTO

Área Temática:

Pesquisador: MARCIA REGINA SILVA QUIROGA

Versão: 1

Instituição: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

CAAE: 05828212.4.0000.0096

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 65110

Data da Relatoria: 31/07/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo retrospectivo sobre análise de dados relacionados a pacientes com anemia aplástica grave que foram submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os pacientes com Anemia Aplástica Severa que tiveram recuperação autóloga em diferentes regimes de condicionamento.
Correlacionar os diferentes níveis de quimerismo com as características clínicas pré-transplante e com as características da evolução pós-transplante, no sentido de identificar fatores que possam prever a evolução do enxerto alogênico de células-tronco hematopoéticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há risco para os pacientes, uma vez que serão analisados dados retrospectivos de registros médicos. O benefício será de melhor conhecer os resultados de diferentes modalidades terapêuticas empregadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a comentar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram incluídos.

Recomendações:

O projeto pode ser aprovado sem pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

CURITIBA, 01 de Agosto de 2012

Assinado por:
Renato Tambara Filho