

CAROLINA BRAGA DE RESENDE

**Efeito do alemtuzumab na Doença do enxerto contra
hospedeiro aguda e na reativação de citomegalovírus em
pacientes submetidos ao transplante de células no Hospital
das Clínicas-UFMG**

Belo Horizonte, MG.

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Efeito do alemtuzumab na Doença do enxerto contra hospedeiro aguda e na reativação de citomegalovírus em pacientes submetidos ao transplante de células no Hospital das Clínicas-UFMG

Belo Horizonte, MG.

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA

Prof. Sandra Regina Goulart Almeida

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ricardo Santiago Gomez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Renato de Lima dos Santos

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Francisco José Penna

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Denise Utsh Gonçalves

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Carolina Braga de Resende

Efeito do alemtuzumab na Doença do enxerto contra hospedeiro aguda e na reativação de citomegalovírus em pacientes submetidos ao transplante de células no Hospital das Clínicas-UFMG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientadores: Prof. Dra. Vanessa Pinho da Silva

Prof. Dr. Henrique Neves da Silva Bittencourt

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus por permitir que eu realizasse este sonho! E ao meu irmão, José Pereira de Resende Neto, pelo apoio e força que sempre me proporcionou durante todo o tempo de realização deste trabalho!! Meu irmão é sinônimo de força e amor na minha vida... Amor incondicional!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão que sempre esteve ao meu lado me ajudando nos momentos de fraqueza e comemorando comigo as situações de vitória. Razão da minha vida e o principal motivador dos meus trabalhos.

Aos Meus pais que me apoiaram incondicionalmente neste desafio de realizar um trabalho de pesquisa.

A minha irmã pelo seu carinho e apoio.

Aos demais familiares e amigos pelo amor e torcida.

Ao meu orientador professor Mauro Martins Teixeira pela oportunidade de desenvolvimento de trabalhos em pesquisa e pela orientação neste trabalho de mestrado!! Muito Obrigada!!!

A minha coorientadora, professora Vanessa Pinho, que me deu a oportunidade de conhecer a pesquisa científica há 7 anos e me fez apaixonar por este Universo. Ela sempre me orientou para um crescimento pessoal e profissional. Sempre me chamando atenção para minhas fragilidades, me ajudando a supera-las e a desenvolver nos trabalhos. Muito Obrigada!!!

Ao meu coorientador, professor Henrique Bittencourt, que sem conhecer meu trabalho permitiu que eu realizasse o meu desejo de conhecer e participar de trabalho relacionado a pesquisa clínica. Desde a minha graduação, pacientemente ele contribui para meu aprendizado e crescimento acadêmico. O prof. Henrique, mesmo fora do Brasil, me ajudou de maneira generosa a fazer todo este trabalho! Muito Obrigada!!!

Aos colegas, Barbara Maximino, Priscila Telles e demais colegas do Laboratório do ICB.

A todos os colegas da Unidade de transplantes do HC-UFMG, em especial Malvina Duarte, Gustavo Machado, Marcia Eller e Glaucia Helena.

Aos colegas da UCO e em especial Gisia Braga que me acompanhou nesta reta final da conclusão do trabalho e foi uma excepcional amiga.

Aos pacientes que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da pós-graduação.

RESUMO

A Doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda e reativação de citomegalovírus (CMV) são importantes complicações do Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico. Este trabalho trata-se de um estudo coorte prospectivo realizado no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2011, na unidade de transplantes do HC-UFMG, Brasil. Este estudo avaliou o efeito do alemtuzumab na incidência da DECH aguda e reativação de CMV nos primeiros 100 dias após TCTH e avaliou sobrevivência global em um ano. Cinquenta e sete pacientes submetidos ao TCTH alogênico foram incluídos neste trabalho. O alemtuzumab foi administrado no condicionamento na dose de 1mg/kg em crianças (máximo de 40mg) e 30mg/ dia por 2 dias em adultos ou crianças quando acima de 40kg (total de 60mg). Quarenta e cinco (78.9%) pacientes foram diagnosticados com doença maligna. Alemtuzumab foi usado em 23 (40.4%) pacientes, sendo que dezessete destes pacientes receberam regime de condicionamento de intensidade reduzida. Onze pacientes apresentaram DECH (gradação 2-4) e deste total somente um paciente recebeu alemtuzumab no condicionamento. A incidência cumulativa da DECH (gradação 2-4) em 100 dias para pacientes que receberam ou não o alemtuzumab foi de 4.3% e 29.4%, respectivamente ($p=0.02$). A incidência cumulativa de reativação de CMV em 100 dias para pacientes que receberam alemtuzumab ou não foi de 61.5% e 32.6%, respectivamente ($p=0.02$). Dezesseis óbitos ocorreram nos primeiros 100 dias após TCTH. Somente dois óbitos foram reportados como causa a DECH aguda e nove (56.5%) óbitos causados por sepse. A sobrevivência global em um ano foi de 50%. O alemtuzumab não impactou na sobrevivência global. O alemtuzumab é eficaz em controlar a DECH aguda, mas aumenta significativamente o risco de reativação de CMV e não melhora sobrevivência global. Nosso resultado pode ser útil para discussão de adaptações no protocolo de prevenção de DECH com alemtuzumab de acordo com condições de transplante e perfil de pacientes submetidos ao TCTH alogênico. Além disso, nós enfatizamos a importância do CMV em pacientes submetidos ao TCTH alogênico no Brasil,

especialmente pacientes que receberam o alemtuzumab, e a necessidade de estratégias efetivas para monitoramento e prevenção de reativação do CMV.

Palavras Chave: Transplante de células tronco hematopoiéticas. Alemtuzumab. Doença do Enxerto contra hospedeiro aguda. Citomegalovírus.

ABSTRACT

Acute Graft-versus-host disease (AGVHD) and cytomegalovirus (CMV) reactivation are important complications of alloHSCT. In this prospective cohort study conducted in the transplantation unit of the HC-UFMG, Brazil, from January 2009 to December 2011, the effect of alemtuzumab on the incidence of AGVHD and CMV reactivation (at 100 days) and overall survival (at one year) after alloHSCT were evaluated. Fifty-seven patients underwent alloHSCT were included. Alemtuzumab was administered before conditioning at a dose of 1mg/kg in children (maximum of 40 mg) and 30mg/ day for 2 days in adults or children with more than 40 kg (a total of 60mg). Forty-five (78.9%) patients had a diagnosis of a malignant disease. Alemtuzumab was used before the conditioning regimen in 23 (40.4%) patients, of whom 17 received a RIC conditioning. Eleven patients presented AGVHD (grades 2-4) and were reported in only one patient when alemtuzumab was used before the conditioning. The cumulative incidences of AGVHD (grades 2-4) at 100 days for patients receiving or not alemtuzumab before the conditioning regimen were 4.3% and 29.4%, respectively ($p = 0.02$). Cumulative incidence of CMV reactivation at D+100 for patients receiving or not alemtuzumab was 61.5% and 32.6%, respectively ($p=0.02$). Sixteen deaths occurred in first 100 days after alloHSCT. Only two (12.5%) deaths were reported as caused by AGVHD and nine (56.5%) deaths caused by sepsis. Overall survival (OS) at one year was 50%. Alemtuzumab do not impact in OS. Alemtuzumab effectively control AGVHD but significantly increases the risk of CMV reactivation and do not improve OS. Our result might be useful to discuss adaptations of AGVHD prevention protocol with alemtuzumab according to transplant conditions and profile of patients underwent alloHSCT. Furthermore, we emphasize the importance of CMV in patients underwent alloHSCT in Brazil, especially in patients receiving alemtuzumab, and the need for effective strategies to prevent and monitoring CMV reactivation.

Keyword: Hematopoietic stem cell transplantation. Alemtuzumab. Graft-versus-host disease. Cytomegalovirus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reconhecimento direto e indireto de aloantígenos	35
Figura 2 - Imunoglobulina formada por cadeias leves e pesadas	41
Figura 3 – Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos....	44
Figura 4 - Cascata da DECH aguda	50
Figura 5 – Ilustração da Classificação por tempo da DECH.....	52
Figura 6 - Algoritmo de tratamento DECH aguda	56
Figura 7 – Representação esquemática do citomegalovírus	57

ARTIGO

Figura 1 – Incidência Cumulativa de DECH (graduação 2-4) e Mortalidade relacionada ao transplante (MRT) nos primeiros 100 dias pós TCTH – Figure 1 - AGVHD (Grade 2-4) cumulative incidence	81
Figura 2 – Incidência Cumulativa de DECH aguda (graduação 2-4) para pacientes que receberam ou não receberam o alemtuzumab nos primeiros 100 dias pós TCTH - Figure 2 - Cumulative incidences of grade 2-4 AGVHD at D+100 for patients receiving or not alemtuzumab before alloHSCT	81
Figura 3 – Incidência Cumulativa de antigenemia para CMV e Mortalidade relacionada ao transplante (MRT) nos primeiros 100 dias pós TCTH – Figure 3 - Cumulative incidence of antigenemia assay after transplant at D+100.....	82
Figura 4 - Incidência Cumulativa de antigenemia para CMV e Mortalidade relacionada ao transplante (MRT) nos primeiros 100 dias pós TCTH para	

pacientes que receberam ou não receberam o alemtuzumab– Figure 4-
Cumulative incidence of CMV reactivation at D+100 for patients receiving or not
alemtuzumab 82

Figura 5 – Sobrevivência Global em um ano após TCTH. – Figure 5 - Overall
Survival at one year 83

Figura 6 – Sobrevivência Global em um ano após TCTH para pacientes que
receberam ou não receberam o alemtuzumab – Figure 6 – Overall survival at
one year for patients receiving or not alemtuzumab..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças com possibilidade de indicação para o TCTH	25
Tabela 2 - Regime de condicionamento de intensidade reduzida.....	30
Tabela 3 - RIC mais usados.....	31
Tabela 4 - Estagiamento DECH aguda	53
Tabela 5 - Graduação da DECH aguda	54

ARTIGO

Tabela 1 – Características dos transplantes, pacientes e diagnósticos – Table 1. Patients, Diagnosis and Transplant Characteristics.....	79
Tabela 2 – DECH aguda (graduação 2-4) e uso do alemtuzumab – Table 2. aGVHD (grades 2-4) according to alemtuzumab use	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Anemia aplásica
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATG	Globulina antitimócito
BAL	Lavado broncoalveolar
BrasilCORD	Rede Nacional de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas
BSCUP	Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
Bu	Bussulfano
CDR	Regiões determinantes de complementariedade
CMV	Citomegalovírus
CNT	Células nucleares totais
CPH	Célula progenitora Hematopoiética
CsA	Ciclosporina
CTH	Células tronco hematopoiéticas
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
CTP	Células tronco periférica
Cy	Ciclofosfamida
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro
EBV	Epstein bar
EUA	Estados Unidos da América
EV	Endovenosa
Flu	Fludarabina

G-CSF	Fator estimulante de Colônias de granulócitos
GI	Gastrointestinal
GPI	Glicophosphatidilinositol
GVL	Enxerto versus leucemia
HC	Hospital das Clínicas
HHV-6	Herpes vírus humano
HLA	Human leukocyte antigen
HSPGs	Proteoglicanos de heparan sulfato
HSV	Herpes simplex
IBMTR	Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea
ICT	Irradiação corporal total
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL-1	Interleucina 1
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LPS	Lipopolissacarídeos
Mel	Melfalano
mHAS	Antígenos de histocompatibilidade menor
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea

M-PBSC	Mobilized Peripheral Blood Stem Cells
MRT	Mortalidade Relacionada ao Transplante
MTX	Metrotexato
NK	Células Natural Killer
PCR-SSO	Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide
PCR-SSP	Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers
RIC	Condicionamento de intensidade reduzida (Reduced Intensity Conditioning)
SBT	Sequence Based Typing
SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNC	Sistema Nervoso Central
Spss	Statistical Package for the Social Sciences
TCR	Receptor de célula T
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VOD	Doença veno-oclusiva
VZV	Varicela-zoster

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	19
INTRODUÇÃO	20
1. TÍTULO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH).....	21
2.1.1 História do TCTH	21
2.1.2 Conceito	23
2.1.3 Indicações	24
2.1.4 Regime de Condicionamento	28
2.1.5 Complexo de histocompatibilidade principal e Imunologia do transplante	31
2.1.6 Fontes de Células e Seleção do doador	36
2.1.7 Infusão de células e características do paciente em pós-transplante	39
2.2 Alemtuzumab	41
2.2.1 Propriedades Farmacológicas e Mecanismo de Ação...	41
2.2.2 Indicação Clínica	45
2.2.3 Emprego no transplante	46
2.2.4 Reações adversas e Contraindicações	47
2.3 Doença do enxerto contra hospedeiro	48
2.3.1 Epidemiologia e Fatores de Risco	48
2.3.2 Fisiopatologia	49
2.3.3 Diagnóstico e Manifestação Clínica	51

2.3.4 Tratamento	55
2.4 Citomegalovírus	57
2.4.1 Biologia Molecular e Clínica	57
2.4.2 Epidemiologia e Fatores de Risco	59
2.4.3 Diagnóstico e Manifestação Clínica	60
2.4.4 Tratamento	61
3. JUSTIFICATIVA	62
4. OBJETIVO	63
4.1 Objetivo Geral	63
4.2 Objetivos Específicos	63
5. MATERIAIS E MÉTODOS	64
5.1 Formato do estudo clínico	64
5.2 Aspectos Éticos	64
5.3 Análise Estatística	65
6. RESULTADOS	66
6.1 Artigo	66
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	96
Anexo 1	96
Anexo 2	97
Anexo 3	98
Anexo 4	99

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O projeto de pesquisa sobre o efeito do anticorpo alemtuzumab na doença do enxerto contra hospedeiro aguda e infecção/ reativação por citomegalovírus foi proposto sob o contexto de início do uso do fármaco no regime de condicionamento dos Transplantes de Células Tronco hematopoiéticas alogênico na unidade de transplante do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG.

O projeto de pesquisa teve início em 2009 com a elaboração de projetos pela aluna que, então, foram encaminhados e aprovados pelo COEP-UFMG no período descrito, sob orientação dos professores Henrique Neves da Silva Bittencourt, Mauro Martins Teixeira e Vanessa Pinho da Silva.

A partir da aprovação, a coleta de dados do projeto foi realizada pela aluna até então como estudante de graduação em exercício da iniciação científica. Ao final da coleta de dados e início das análises a aluna foi aprovada no programa de pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG. Todo o projeto de pesquisa foi desenvolvido pela aluna em colaboração de colegas pesquisadores e sob a orientação dos professores referenciados.

INTRODUÇÃO

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é uma importante opção no tratamento de doenças oncológicas e não oncológicas como as leucemias, anemias e desordens de imunodeficiência severa¹. Essa terapêutica tem seu sucesso limitado pelo desenvolvimento de complicações como a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda e infecção/ reativação pelo citomegalovírus (CMV)². Tais complicações apresentam alta frequência no pós transplante o que confere a DECH aguda e a infecção/ reativação de CMV importância clínica e científica.

Diversos fatores são considerados de risco para incidência dessas doenças como: regime de condicionamento; origem do enxerto; compatibilidade HLA; soropositividade de receptor e doador para CMV; profilaxia e tratamento de CMV; exames de controle de infecção/ reativação de CMV pós-transplante; além da profilaxia e tratamento da DECH^{3,4,5,6}. Dessa forma, alterações nessas variáveis do transplante devem ser analisadas e discutidas criteriosamente para que as melhores escolhas de tratamento sejam empregadas nos serviços de transplantes.

O alemtuzumab começou a ser usado no esquema de fármacos do regime de condicionamento do TCTH alogênico da unidade de transplantes do Hospital das Clínicas – UFMG. O alemtuzumab é um anticorpo monoclonal que atua na depleção de linfócitos a partir do reconhecimento da molécula de membrana celular CD52⁷. Estudos que avaliam o uso do alemtuzumab no regime de condicionamento do TCTH e seu efeito na prevenção da instalação e melhora da severidade da DECH aguda e infecção/ reativação por CMV tem sido cada vez mais explorados e bons resultados de prevenção de DECH estão descritos.

Tendo em vista a importância clínica da DECH aguda e da infecção/ reativação do CMV associado ao fator de inclusão do alemtuzumab ao protocolo do TCTH alogênico do Hospital das Clínicas da UFMG o presente trabalho se propõe a avaliar o efeito do alemtuzumab na incidência da DECH aguda e infecção/ reativação de CMV e avaliar o seu impacto na sobrevida dos pacientes.

1. TÍTULO

Efeito do alemtuzumab na doença do enxerto contra hospedeiro aguda e na reativação de citomegalovírus em pacientes submetidos ao transplante de células no Hospital das Clínicas-UFMG.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH)

2.1.1 História do TCTH

O TCTH teve seu desenvolvimento marcado por diversas pesquisas realizadas em animais e posteriormente em seres humanos. Tais estudos permitiram a identificação de fatores correlacionados ao efeito benéfico da ablação de medula resultante de radiação, hematopoese originária de medula saudável e fatores relacionados a compatibilidade entre doador e receptor.

Os primeiros trabalhos desenvolvidos e publicados aproximadamente em 1949 demonstraram que camundongos sobreviveriam após a irradiação total quando o baço, órgão importante na hematopoiese de camundongos, fosse protegido dessa irradiação letal⁸. Posteriormente, outros estudos mostraram que não só a proteção do baço levava a maior sobrevivência, mas também a infusão de células da medula teriam efeito protetor e acarretaria maior sobrevivência nos casos de animais que recebessem medula singênica⁹.

Barnes e colaboradores (1956) descreveram o tratamento de camundongos com leucemia através da irradiação letal e o transplante de medula. Thomas e colaboradores (1970) demonstraram em trabalhos clínicos que apesar da morte e pancitopenia causada pela irradiação, houve também um efeito anti-leucemia durante quatro meses após irradiação e transplante. Além disso, a conclusão de que a infusão intravenosa de medula óssea poderia restaurar a função de hematopoese

em humanos submetidos à irradiação total foi também considerado um importante avanço para a época⁹.

O conhecimento da histocompatibilidade entre pessoas foi um marco no desenvolvimento do TCTH e teve início em 1954 através do reconhecimento de anticorpos induzidos pela transfusão de antígenos de células do sangue⁹. Epstein e colaboradores (1968) desenvolveram a tipagem de antígenos de leucócitos de cães e os resultados mostraram que enxertos de medula entre cães de linhagens diferentes sempre falhavam¹⁰. Dessa forma, foi demonstrada a importância clínica dos antígenos de leucócitos para o sucesso do TCTH. Esses antígenos são conhecidos como *human leukocyte antigen* (HLA). Na mesma época, também foi demonstrado que o uso de metrotexato (MTX) como imunossupressor após transplante resultaria em melhor sobrevivência¹¹.

O maior desenvolvimento clínico de TCTH ocorreu a partir do crescimento do serviço transplante de medula óssea localizado em Seattle (Estados Unidos) a partir de 1968, com investimentos na montagem de equipe de profissionais e estrutura para o TCTH. O primeiro transplante deste serviço ocorreu em 1969 em paciente com leucemia mieloide crônica (LMC) o qual foi submetido a irradiação e transplantado com infusão de medula intravenosa⁹. A pega do enxerto ocorreu no décimo terceiro dia após o transplante e o paciente apresentou doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) leve⁹. Após a morte, que ocorreu 56 dias após o transplante, foi realizada autópsia que evidenciou pneumonia por citomegalovírus (CMV)⁹. Desde os primeiros transplantes até a atualidade o desafio de controle da DECH aguda e infecção/ reativação por CMV tem sido grande para o sucesso dos TCTH alogênico. George Mathé foi pioneiro no TCTH clínico e foi quem descreveu, inicialmente, a ocorrência de DECH aguda⁹.

No Brasil, o transplante de células desenvolveu inicialmente graças ao trabalho do grupo do professor Ricardo Pasquini, no estado do Paraná, sendo o primeiro transplante do país realizado em 1979¹¹. No ano de 1993 foi realizado nesse estado o primeiro TCTH de cordão umbilical da América Latina¹¹. Atualmente, são 52 unidades credenciadas para transplante autólogo, 36 para TCTH alogênico e 15 para TCTH alogênicos aparentados e não aparentados no país.

No HC-UFMG o programa de TCTH foi criado em 1995 com direção do professor Wellington Azevedo e, inicialmente, o serviço foi destinado a realização de transplante alogênico aparentado. Apenas em 2005, com coordenação do serviço realizada pelo professor Henrique Bittencourt, a unidade foi credenciada a realização de transplante do tipo não aparentado e em 2006 foi realizado o primeiro transplante da unidade tendo o cordão umbilical como fonte de células.

2.1.2 Conceito

O TCTH ou o chamado transplante de medula óssea, conhecido por este último nome porque a primeira fontes de células progenitoras utilizada foi a medula óssea (MO), consiste na infusão de células pluripotentes do sistema hematopoiético em pacientes para tratamento de doenças hematológicas de origem neoplásica e não oncológicas (como certos tipos de anemia)¹².

Há três tipos de TCTH que se diferenciam quanto ao doador das células tronco hematopoiéticas (CTH):

- Transplante autólogo: as células provêm do próprio paciente que são colhidas antes da submissão ao protocolo de condicionamento (descrito no item 2.1.4), associando quimioterapia ou radioterapia, e em seguida é realizado o transplante^{13,14}. Esta modalidade de transplante é considerada de menor risco de complicações quando comparado ao transplante alogênico devido a ausência de reação imunológica por incompatibilidade gênica^{13,14}.

- Transplante alogênico: as células são de doador voluntário, geneticamente diferente do receptor, podendo apresentar ou não compatibilidade HLA e parentesco familiar ao receptor^{13,14}. Neste transplante existe o risco de reações imunológicas entre células do doador (enxerto) e receptor devido a incompatibilidade gênica^{13,14}. Então, há o risco de ocorrência da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH ou GVHD – sigla em inglês) aguda ou crônica, principal complicação clínica pós-transplante alogênico e ocorrência do efeito enxerto versus leucemia (GVL) que é importante no controle de recidiva de células tumorais^{13,14}.

- Transplante singênico: é realizado entre gêmeos geneticamente idênticos
13,14.

2.1.3 Indicações

A indicação do TCTH envolve a avaliação de diversos fatores para que os possíveis benefícios obtidos desta terapêutica superem riscos de complicações ou o grau de gravidade de doença de base em que o paciente se encontra no período de avaliação para o transplante. As principais doenças com indicação para TCTH estão descritas na tabela 1 e os principais casos envolvendo TCTH alogênico serão brevemente discutidos.

Tabela 1 - Doenças com possibilidade de indicação para o TCTH.

TRANSPLANTE AUTÓLOGO
Doenças Malignas
Mieloma Múltiplo
Linfoma não Hodgkin
Linfoma Hodgkin
Neuroblastoma
Outras doenças
Doenças autoimune: Lúpus eritematoso sistêmico; Esclerose Múltipla
TRANSPLANTE ALOGÊNICO
Doenças Malignas
Leucemia mielóide aguda
Leucemia linfóide aguda
Leucemia mielóide crônica
Leucemia linfóide crônica
Síndrome mielodisplásica
Mieloma Múltiplo
Linfoma não Hodgkin: Linfoma folicular; células do manto
Linfoma Hodgkin
Outras doenças
Anemia aplásica
Anemia de fancone
Anemia falciforme
Distúrbios de imunodeficiência
Talassemia

Fonte: Criada para este trabalho pelo próprio autor.

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia mais frequente em crianças sendo referenciada em 80% de casos de leucemias neste grupo e, em adultos acomete 15% dos diagnósticos de leucemias^{15,16}. Esta doença é caracterizada pelo crescimento e proliferação de blastos e infiltração celular em diversos tecidos. A indicação para o TCTH alogênico em LLA de alto risco ocorre quando houver presença de cromossomo Philadelphia positivo, leucocitose, infiltração de tecido nervoso central por células neoplásicas, idade superior a 35 anos e em caso de pacientes submetidos ao tratamento de LLA com quimioterápicos por quatro semanas sem resposta^{15,16}. Em caso de segunda remissão completa da LLA associada a condição clínica controlada, o TCTH alogênico também é indicado em muitas situações^{15,16}.

A leucemia linfóide crônica (LLC) ocorre usualmente em pessoas com idade avançada e representa 0,8% dos tumores¹⁷. Os pacientes com LLC resistente ao tratamento com análogos de purina podem apresentar apenas dez meses de sobrevida¹⁷. Eles têm como única opção curativa o TCTH alogênico e esta terapêutica deve ser considerada como opção de tratamento em casos de pacientes com doença agressiva ou em progressão. Esta doença tem como principal característica celular a proliferação de linfócitos B maduros e seu acúmulo em tecidos linfóides, MO e sangue periférico¹⁷.

O linfoma folicular é caracterizado por proliferação de células B periféricas diferenciadas¹⁵. A indicação para o TCTH alogênico segue os seguintes critérios: pacientes em segunda recaída da doença, quando o quadro de remissão inicial for menor do que o período de doze meses e quando ocorrer modificação para linfoma difuso¹⁵.

A leucemia mielóide aguda (LMA) se caracteriza pela proliferação de células imaturas de progenitor mielóide que resulta em prejuízos funcionais do sistema imune¹⁸. O TCTH alogênico é indicado para os casos de mau prognóstico (citogenética desfavorável) e casos de LMA refratária¹⁸.

A LMC ocorre por causa de translocação entre cromossomos 9 e 22 que resulta em alteração de atividade de tirosina-quinase citoplasmática de células alteradas¹⁵. Esta doença pode manifestar em qualquer idade e é responsável por

20% das leucemias¹⁵. O TCTH é um potencial tratamento embora muito raramente utilizado nos dias de hoje pelo desenvolvimento de novas terapias¹⁵.

Síndrome mielodisplásica (SMD) é o nome dado a alterações de medula óssea definida como alterações em células progenitoras hematopoiéticas com citopenia (contagem de células baixa) periférica¹⁵. A celularidade da medula óssea e o curso clínico dessa doença é bastante variável¹⁵. A SMD é mais frequente em idosos e o tratamento dessa doença utilizando TCTH é indicado para situações de alto risco de complicações relacionados a doença e para pacientes que evoluem para LMA¹⁵.

Anemia aplásica (AA) é uma doença caracterizada por estado em que o paciente apresenta pancitopenia associado a uma medula acelular ou hipocelular, ou seja, apresenta menos de 30% de células hematopoiéticas funcionais^{19,20,21}. As causas podem ser relacionadas à exposição a fatores agressores como radiação, produtos químicos ou agentes citotóxicos (por exemplo, quimioterápicos). Entretanto, grande parte dos casos de AA não apresenta causa definida. Pacientes com esse diagnóstico são selecionados para o TCTH alogênico em caso de diagnóstico precoce da doença e idade de 40-50 anos em casos de transplante com doador relacionado compatível em HLA^{19,20,21}. Em situações em que o paciente sem doador na família apresenta falha ao tratamento com imunossupressor com globulina antitimócito (ATG) e ciclosporina (CsA) o TCTH não aparentado pode ser considerado como opção de tratamento^{19,20,21}.

Por fim, o mieloma múltiplo (MM) é caracterizado por proliferação de clone de plasmócitos e essas células apresentam capacidade de produção de proteínas monoclonais¹⁵. A incidência é maior para pessoas com idade acima de 60 anos. O transplante autólogo resulta melhor sobrevida global quando efetivado em primeira remissão da doença. O TCTH alogênico é opção em caso de pacientes jovens, com regime de condicionamento reduzido e após realização do transplante autólogo¹⁵.

Há outras doenças e outros critérios clínicos mais específicos que são avaliados para indicação e realização de TCTH alogênico, porém não foi completamente descrito neste texto por não ser o foco do trabalho. Por isso, é ressaltado que a indicação desta terapêutica requer avaliações criteriosas e segue critérios clínicos e de protocolo dos centros de transplantes.

2.1.4 Regime de Condicionamento

O regime de condicionamento é o emprego de fármacos quimioterápicos associados ou não com radioterapia nos pacientes em período pré-transplante para preparo do receptor para o enxerto de células. Ele é realizado com a finalidade de eliminação das células de origem maligna e indução de imunossupressão para redução do risco de rejeição ao enxerto¹².

A definição dos fármacos e doses que atualmente são empregadas no regime de condicionamento demoraram vários anos para atingir a etapa de emprego clínico em formato sistemático em protocolos de transplantes. Isso se deve aos riscos de toxicidade hematológica em órgãos como coração, sistema nervoso central (SNC), pulmões, fígado e trato gastrointestinal que pode comprometer a vida do paciente²².

Os critérios para utilização de fármacos ou radioterapia no regime de condicionamento seguem protocolos institucionais e podem variar conforme a fase da doença de base do paciente receptor, conforme risco de complicações pré e pós-transplante e ao tipo de transplante de células realizado (grau de compatibilidade HLA, doador não relacionado versus relacionado e fonte de células). As doses de fármaco/radioterapia usados no regime de condicionamento devem combinar uma toxicidade tolerável com o menor risco possível de recidiva da doença de base do receptor.

O regime de condicionamento mieloablativo pode ser obtido através do emprego de irradiação corporal total (ICT) ou combinação de fármacos quimioterápicos em altas doses²². Em 1970 teve início o uso da ICT no regime de condicionamento seguindo os objetivos de imunossupressão e erradicação de células tumorais²². Alguns autores defendem o uso ICT em relação aos quimioterápicos pelo fato da dose e efeito serem independentes de vascularização do tecido ou de processos metabólicos que alteram os efeitos de fármacos quimioterápicos²².

Utiliza-se para ICT aceleradores lineares com doses que podem variar de 10 a 16 cGy e são aplicadas de maneira fracionada em associação ao uso de fármacos quimioterápicos²². É importante destacar que doses próximas de 10cGy ou menores não são consideradas mieloablativas²². Os efeitos colaterais do condicionamento com ICT contemplam a catarata, retardo de crescimento, esterilidade, pneumonite e neoplasia secundária²³. Na Unidade de transplantes do HC-UFMG não é realizada a

ICT, porém outros centros empregam essa terapia de maneira fracionada com a finalidade de minimizar os efeitos colaterais tardios.

Os fármacos utilizados no regime de condicionamento são variados e os protocolos seguem o formato de associação de medicamentos para melhores resultados. Considerando que serão abordados neste trabalho apenas os principais fármacos usados na Unidade HC-UFMG, destaque para os agentes alquilantes que apresentam capacidade de destruição celular em qualquer fase do ciclo, apresentam maior toxicidade hematológica e a resistência a estes fármacos são pouco frequentes se comparada a outras drogas²². Dentro deste grupo de agentes alquilantes temos o bussulfano (Bu), melfalano (Mel), ciclofosfamida (Cy), entre outros²².

O Bu apresenta intensa capacidade de causar mieloablação apesar do fator definidor deste efeito ser a dose utilizada²². Pode ser administrado por via oral, comprimidos, ou por via endovenosa (EV) sendo esta última a forma de melhor garantia de efeitos sobre a célula devido a menor risco de problemas com biodisponibilidade²². Na unidade HC-UFMG é disponível o Bu em comprimido tendo em vista que a apresentação desse fármaco para administração EV tem custo muito mais elevado.

O Mel é um fármaco que associa a mostarda nitrogenada e a fenilalanina, nos esquemas de regime de condicionamento é associado ao Bu e carmustina podendo também ser empregado juntamente com ICT. A Cy é altamente imunossupressora apresentando como limite de tolerabilidade a dose de 200mg/kg e um dos seus principais efeitos colaterais é a cistite hemorrágica²².

Existem outras classes de fármacos usadas nos regimes de condicionamento como a fludarabina (Flu) que pode ser administrada juntamente com Bu, Mel e ciclofosfamida em regimes de intensidade reduzida. A aplicação de fármacos com doses mieloablativas não é garantia de erradicação do tumor uma vez que é conhecido o efeito de resistência das células tumorais através de mecanismos como o aumento de reparo de DNA, desintoxicação celular do quimioterápico e aumento de expressão dos genes que protegem a célula doente, impedindo o efeito desses agentes em erradicar o tumor²².

Atualmente, busca-se usar fármacos que apresentam ação específica sobre células para obtenção de resultados mais satisfatórios no que se refere a ação antitumoral associando ao efeito a menor toxicidade. O alemtuzumab, foco deste

estudo, é incluído como opção de fármaco para o regime de condicionamento com efeito direcionado a depleção de linfócitos²⁴. Este anticorpo é empregado em associação a outros fármacos e a dose pode variar conforme protocolo institucional. No HC-UFMG a dose em pré-transplante do alemtuzumab em crianças é de 1mg/kg (para crianças com até 40 kg) e nos pacientes adultos é administrado 30mg/dia durante 2 dias, com dose máxima de 60mg em cada paciente.

O regime de condicionamento não mieloablativo ou *reduced intensity conditioning* (RIC) surgiu como opção de condicionamento na década de 1990 devido à necessidade que os grupos de transplantes tinham em diminuir os efeitos oriundos da toxicidade do regime mieloablativo e melhorar a sobrevida dos pacientes relacionada ao transplante²⁵. O RIC pode ser definido pela dose aplicada de fármacos conforme resumido nas tabelas 2 e 3. Por definição, o paciente submetido a um RIC deverá apresentar reconstituição autóloga da sua medula em um período aproximado de vinte e oito dias se não houver infusão de células tronco alogênicas²⁵.

Tabela 2 - Regime de condicionamento de intensidade reduzida (RIC).

ICT	Dose total < 500cGy
Bu	Dose total < 9mg/kg
Mel	Dose total < 140mg/m ²
Tiotepa	Dose total < 10mg/kg

Fonte (modificada): Transplante de Células tronco hematopoiéticas. Ed.: Atheneu, 2010.

Bu: bussulfano; ICT: Irradiação corporal total; Mel: Melfalano

Tabela 3 - RIC mais usados.

ICT 200cGy e +/- Flu
Bu + Flu e +/- outros fármacos
Flu + Cy e +/- outros fármacos
Flu + Mel e +/- outros fármacos
Flu e +/- outros fármacos

Fonte (modificada): Transplante de Células tronco hematopoiéticas. Ed.: Atheneu, 2010.

Bu: bussulfano; Cy: ciclofosfamida; ICT: Irradiação corporal total; Mel: Melfalano.

O tipo de regime de condicionamento usado no TCTH para doenças oncológicas interfere no risco de recidiva devido à possibilidade dos pacientes apresentarem células residuais de origem tumoral. Dessa forma, o efeito enxerto-versus-leucemia ou *graft-versus-leukemia* (GVL) é considerado fundamental para redução do risco de recidiva da doença oncológica de base do paciente após o transplante²³. O GVL, resumidamente, é definido como uma reação imunológica dos linfócitos imunocompetentes contra as células tumorais e, então, o GVL é caracterizado pelo seu efeito de controle no crescimento tumoral²⁶.

No presente trabalho, foi considerado regime de condicionamento mieloablativo aquele que utilizava o Bu em dose maior do que 10mg/kg com uso concomitante da ciclofosfamida (BuCy). Todas as outras combinações de fármacos utilizados nos pacientes submetidos ao TCTH no serviço do HC-UFMG foram consideradas como RIC.

2.1.4 Complexo principal de histocompatibilidade e Imunologia do transplante

As moléculas do complexo de histocompatibilidade principal ou *Major Histocompatibility Complex* (MHC) são glicoproteínas de superfície celular presentes em vários tipos de células incluindo células apresentadoras de antígenos (APCs)

que tem a propriedade de se ligar a peptídeos de antígenos e apresentá-los aos linfócitos T. Então, a apresentação e reconhecimento do antígeno resultam na ativação de resposta imunológica a estruturas e moléculas estranhas ao organismo²⁷. Essas glicoproteínas foram primeiramente identificadas pelos seus efeitos na imunologia dos transplantes e por isso o nome relacionado a compatibilidade^{27,28}.

O MHC no homem tem seus genes chamado de *human leukocyte antigen*, ou sistema HLA, por terem sido inicialmente detectados nos leucócitos. O HLA se localiza no braço curto do cromossomo 6 contendo mais de 300 genes em sua composição, o qual tem 30% de função relacionada a imunidade^{9,27,28}. O mapa detalhado do locus do MHC é composto por vários genes com funções como processamento e apresentação de antígenos (HLA-A, B, C, DM, DO DP, DQ e DR), função inflamatória (DAXX, ABCF1, LTA, LTB, TNF, entre outras), maturação de leucócitos, cascata do sistema complemento (C2, C4A e C4B), entre outros genes que tem participação em processos fisiológicos como regulação imune e imunologia materno-fetal⁹.

Destacamos as duas classes de genes de MHC definidos como MHC classe I e MHC classe II (ou HLA classe I e HLA classe II) que tem importância no TCTH devido a propriedades funcionais e estruturais relacionadas à imunologia^{27,28}. As diferenças estruturais de HLA classe I e HLA classe II estão de acordo com variações em suas interações celulares como, por exemplo, linfócitos citotóxicos reconhecem peptídeos apresentados por moléculas HLA classe I enquanto linfócitos T helper reconhecem moléculas HLA classe II^{9,27,28}. No MHC de classe I há três genes de cadeia α denominados de HLA- A, -B e -C e no MHC de classe II tem três pares de genes de cadeia α e β chamados de HLA-DR, -DP e -DQ^{27,28}.

Os vários genes que compõem cada classe do MHC permite a codificação de glicoproteínas variadas de MHC e com afinidade a uma gama de peptídeos para ser expresso na superfície celular. Este mecanismo permite que a resposta imune ocorra a partir do reconhecimento de diferentes antígenos e de composição peptídica variada²⁷.

O MHC possui as propriedades de poligênia e polimorfismo que confere ao sistema imune a alta capacidade de resposta a variados antígenos²⁷. A poligênia

refere-se à diversidade de genes MHC classe I e classe II que permite que cada indivíduo tenha um grupo de moléculas com diferentes especificidades²⁷. O polimorfismo são as múltiplas variantes alélicas de cada gene presente em toda a população em geral²⁷.

Tendo em vista as características do MHC e suas funções relacionadas a imunidade, a prevenção de reações relacionadas a essas moléculas é primordial para obtenção de melhores resultados clínicos no TCTH. Então, para diminuir o risco do paciente desenvolver uma resposta alérgica direcionada a antígenos do MHC faz-se a tipificação HLA humano entre receptor e doador.

Historicamente, o principal exame realizado era de linfototoxicidade que é um método sorológico de reconhecimento de antígenos de membrana celular de linfócitos por reação de anticorpo monoclonal^{9,12,27,28}. Os métodos por biologia molecular como PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers) e a PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide) permitem que a tipagem seja realizada em dois níveis de resolução, baixa ou alta, dependendo do conjunto de sondas aplicadas no teste²⁸.

A tipagem de baixa resolução permite a identificação de dois primeiros dígitos que indicam no grupo os alelos pertencentes, grupos esses que correspondem às especificidades sorológicas, como: A*03 (A3) e B*07 (B7). O exame de alta resolução usa um conjunto adicional de primers (SSP) ou sondas (SSO) que permite a identificação dos alelos propriamente ditos: A*0302, B*0702, DRB1*0301, entre outros. Contudo, o método mais adequado para a tipificação de alta resolução é o sequenciamento direto do DNA ou SBT (Sequence Based Typing)^{9,12,27,28}.

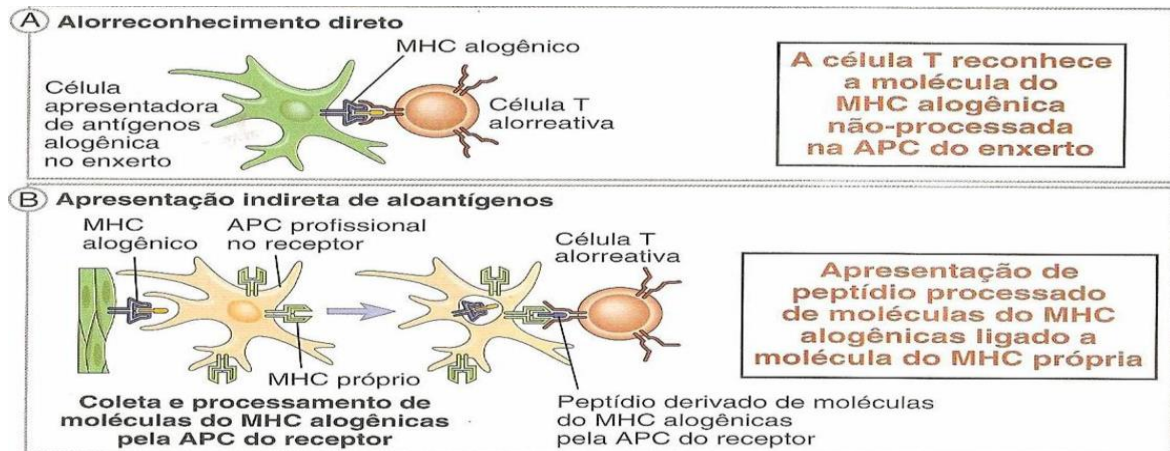
Para a seleção de doador tem sido utilizada a seleção de cinco locus: HLA-A, B, C, DRB1 e DQB1. A descrição entre a tipagem dos alelos de doadores e receptores com 10 alelos em cinco loci é referenciado como “10/10 alelos matched (compatíveis)”. Quando considerado três loci (HLA-A, B, e DRB1) o termo utilizado é “6/6” referenciando amostras de antígenos de HLA-A, B e DRB1 em testes de baixa resolução. Em caso de tipagem de alta resolução para DRB1, o termo “6/6” destaca a compatibilidade de antígenos HLA-A e B e alelos de DRB1. Por fim, o termo “8/8” é usado para compatibilidade de alta resolução nos quatro loci: HLA-A, B, C e DRB1⁹.

Pacientes e doadores “matched” (compatíveis) para HLA-A e B detectados por técnica de baixa resolução podem ser “mismatched” (não compatíveis) para alelos HLA-A e/ou HLA-B o que resulta na necessidade de tipagem de alta resolução para garantia de compatibilidade HLA. O desenvolvimento da metodologia molecular de alta resolução possibilitou a identificação dos alelos e, conseqüentemente, desvendou incompatibilidades não reveladas pelos métodos sorológicos ou moleculares de baixa resolução^{9,12,27,28}.

É importante ressaltar que o polimorfismo do HLA não permite que a tipagem seja totalmente precisa e a presença dos chamados antígenos de histocompatibilidade menores (mHAS) é outro fator limitante no processo de verificação compatibilidade para o transplante. Estes antígenos tem sua grande maioria codificada por genes autossômicos. Sabe-se que existe uma série de proteínas que são codificadas no cromossoma Y e estão envolvidas em respostas imunológicas de histocompatibilidade menor²⁷.

As respostas imunes relacionadas ao TCTH alogênico iniciam com o reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T que são expressos em APCs via MHC. Há duas formas de apresentação de antígenos definidas como apresentação direta e apresentação indireta^{9,28,29}. A apresentação direta de aloantígenos acontece quando células T alorreativas reconhecem MHC alogênico de APCs do doador sem processamento de peptídeo. Enquanto que a via de apresentação indireta de antígenos ocorre a partir do processamento intracelular de moléculas de MHC do enxerto por APCs do receptor e os peptídeos resultantes deste processamento são apresentados via MHC próprio, ou seja, MHC do receptor^{9,28,29} (Figura 1).

Figura 1 - Reconhecimento direto e indireto de aloantígenos.



Fonte: Abbas, A.K. et al. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed., 2007.

Na literatura também tem sido descrito a apresentação de peptídeos gerados a partir de disparidades mHAs que também são expressados em MHC classe I e Classe II⁹. A importância dos mHAs em promover resposta aloimune de células T ocorre em casos de ausência de disparidades MHC e entre cromossomos Y e X⁹. No entanto, existem diferenças das respostas geradas a partir do MHC e do mHAs como, por exemplo, a resposta imune resultante de reconhecimento de mHAs não resulta na formação de anticorpos aloimune e a proporção de epítopos gerados por mHAs é menor do que são gerados por MHC⁹.

Então, a resposta gerada apenas por mHAs pode ser de menor intensidade, conforme disparidades, quando comparada à resposta gerada por reconhecimento de MHC, porém não menos importante nas rejeições de enxerto. A compatibilidade HLA se configura como um dos principais fatores relacionados às rejeições ao enxerto associado a outros fatores do transplante que também contribuem para as reações imunológicas envolvidas no TCTH, como destacado em tópicos deste texto.

2.1.6 Fontes de Células e Seleção do Doador

O TCTH é realizado através da infusão de células progenitoras obtidas das seguintes fontes: Medula óssea (MO); células tronco do sangue periférico (CTP ou PBPCs); células de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP); ou células cultivadas³⁰. As três primeiras fontes citadas foram utilizadas no serviço de transplante do HC-UFMG durante o período de realização deste trabalho de pesquisa.

As células da MO são colhidas através da punção da crista ilíaca posterior e, ocasionalmente, da crista ilíaca anterior³¹. A punção da crista ilíaca é realizada em sala de bloco cirúrgico, sob técnica estéril e a aspiração da cavidade óssea em que concentra a medula é realizada através de seguidas punções no local com uso de agulha calibrosa conectada a seringa estéril^{30,31,32}. Em seguida, o volume de medula obtido é transferido para recipiente estéril que contenha solução anticoagulante^{30,31,32}.

A cada punção da MO é obtido um volume variável de medula. Atualmente, o volume adequado para o transplante corresponde a contagem de células nucleadas em torno de $3-4 \times 10^8$ células/Kg^{30,31,32}. A medula óssea é a fonte mais comum de células utilizada no TCTH, apesar do crescente aumento do emprego das CTP desde a década de 90 para transplantes autólogos e alogênicos^{30,31,33}.

As CTPs são obtidas por técnica de aférese, ou seja, coleta de sangue utilizando equipamento automatizado¹³. O doador das células recebe fator de crescimento hematopoiético ou fator estimulador de colônias de granulócitos – G-CSF (Filgrastima) antes do procedimento de aférese¹³. O G-CSF estimula proliferação de células da medula e sua liberação para a circulação¹³.

Trabalhos mostram que o uso de CTP é melhor na reconstituição de neutrófilos e plaquetas com reduzido tempo em relação a MO. O risco de desenvolvimento de doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda é similar entre as duas fontes^{30,34,35,36}. No entanto, as CTP aumentam o risco de DECH crônica, mas neste caso tem apresentado boa resposta ao tratamento imunossupressor, e a sobrevida dos pacientes que recebem CTP tende a ser melhor do que os receptores de MO, quando avaliado por um curto período de tempo pós TCTH^{30,34,35,36}.

Tendo em vista alguns resultados que mostram benefícios de uso das CTP em relação a MO, é necessário ser cauteloso em generalizações uma vez que fatores tais como estágio da doença de base, regime de condicionamento, transplante relacionado ou não relacionado, compatibilidade HLA e profilaxia da DECH interferem nos resultados obtidos.

O uso de SCUP para transplantes foi proposto por Edward e colaboradores (1982) e tem se difundido com a criação de bancos de cordão umbilical de acesso regulamentado e público para doação. O primeiro banco de células de SCUP foi criado na escola de Medicina da Universidade Indiana, nos Estados Unidos³¹. No Brasil, a portaria nº2.381 de 2004 cria a Rede Nacional de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para Transplantes de Células Tronco Hematopoiéticas (Brasil Cord), com a finalidade de regulamentar o processo de armazenagem, doação e uso em transplantes de SCUP de bancos em instituições públicas brasileiras. O Brasil Cord foi formado pelos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário - BSCUP já existentes na época da regulamentação ou que vieram a ser criados em todo o país.

Atualmente, no Brasil estão em funcionamento 11 BSCUP públicos como, por exemplo, no Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro³⁷. A doação de células do cordão umbilical é realizada através do consentimento livre e esclarecido da gestante e a coleta com a finalidade de doação para os bancos de sangue só é efetivada em unidades hospitalares que tenham o BSCUP em atividade³⁷.

Para coleta e doação de SCUP a gestante é previamente submetida a exames de doenças infecto contagiosas como vírus HIV, sífilis e hepatite. A coleta das células pode ser *in situ* que é a coleta realizada com a placenta intraútero ou coleta *ex vivo* em que se faz a coleta depois de retirar a placenta³⁸. Os dois métodos apresentam vantagens e desvantagens e ainda são focos de discussões e pesquisas para melhor se obter células livres de agentes infecciosos associados a obtenção de maior quantidade de células por unidade de SCUP³⁸.

A unidade de SCUP contém, em média, um volume de 120mL, com 0,8 a 10×10^8 células nucleadas totais (CNT) e a contagem de células CD34 pode variar após criopreservação. Em laboratório, as células progenitoras são separadas e congeladas (criopreservadas). Após realização de exames genéticos e testes de doenças infecciosas, e em caso de ausência de alterações, a bolsa de células ou a chamada unidade de SCUP são liberadas para serem registradas no banco

brasileiro e disponibilizadas em caso de necessidade para transplante com pacientes compatíveis³¹.

As SCUP são uma alternativa de fontes de células para o TCTH de doador relacionado quando comparado com a fonte de MO, pois trabalhos tem mostrado baixo risco de DECH aguda, um período de um mês para reconstituição de neutrófilos e plaquetas e sobrevivência similar ao uso de MO^{39,40,41}. Além disso, as células de SCUP podem ser empregadas com mínimas disparidades gênicas entre receptor e doador com menor risco de reatividade comparado CTP ou MO³⁰. No entanto, as unidades de SCUP tem volume limitado de células, sendo necessário, em alguns casos, uso de duas unidades para um único transplante e isso aumenta incompatibilidades e riscos para reações imunes³⁰.

Em transplantes de doador não relacionado, o uso de SCUP é considerado opção de escolha em caso de falta de MO compatível, porque os riscos de atraso de reconstituição de neutrófilos e desenvolvimento de DECH aguda tem sido similar entre as fontes MO e de SCUP sendo diretamente influenciado pelo grau de disparidade do sistema HLA^{39,40,41}.

Apesar dos vários estudos que descrevem resultados positivos de uma fonte de células sobre a outra, considerando variáveis do transplante, a MO era mais difundida e mais empregada nos centros de transplantes até recentemente. O emprego de CTP tem crescido devido aos resultados positivos nos TCTH e também pela facilidade de coleta e obtenção. No período de realização deste trabalho de pesquisa na unidade de transplantes do HC-UFMG o uso de CTP como fonte de células foi predominante em relação a MO e SCUP. As SCUP foram utilizadas em apenas dois transplantes.

Associado a importância da fonte de células, o doador para o TCTH alogênico também é relevante para o sucesso do transplante e sofre influencia direta de fatores como disponibilidade de doador com HLA compatível, doença de base do receptor, urgência do transplante e protocolo institucional. O doador totalmente compatível com o receptor está associado a melhores resultados de sobrevida do receptor^{42,43}.

O doador voluntário não relacionado tem sido o mais amplamente utilizado nos serviços de transplantes, apesar de sofrer influências da dificuldade de identificação de doadores compatíveis ao receptor e requerer maior tempo para

identificação, seleção e doação das células progenitoras⁴². Vários fatores interferem na seleção deste doador voluntário não relacionado, sendo o mais importante o grau de compatibilidade HLA e, para isso, a tipagem HLA de alta resolução tem contribuído para identificações mais precisas. Os trabalhos mostram que o aumento do risco de falha de “pega” do enxerto e do risco de DECH estão relacionados ao número e classes de alelos não compatíveis entre doador e receptor^{44,45,46}.

Além disso, a presença de anticorpos anti-HLA para transplantes com doadores não relacionados e com disparidades HLA tem sido também considerada fator de risco para falhas^{45,46}. Outros fatores que diminuem o risco como, por exemplo, soronegatividade para citomegalovírus, idade jovem e sexo feminino são considerados na seleção do doador compatível não relacionado quando existe a identificação de mais de um potencial doador HLA compatível^{45,46}.

Na seleção de doador de SCUP destacamos a variação de sorológica de HLA-A e B e a tipagem de alta resolução para DRB1, então, que neste tipo de transplante é considerado completamente compatível quando ocorre compatibilidade em 6/6 lócus verificados. Esta definição desconsidera possíveis incompatibilidades entre doador e receptor e pode aumentar o risco de DECH e falha de enxerto^{43,44,45,46}.

O uso de enxerto proveniente de doador parcialmente compatível (haploidêmico) da mesma família do receptor tem sido considerado como última opção de escolha para o TCTH alogênico de pacientes em estágios avançados de doenças malignas. Nos últimos 20 anos, avanços em controle da DECH grave, técnicas de depleção de células T, suporte microbiológico e de banco de sangue, entre outros fatores contribuíram para resultados favoráveis ao uso desse doador no TCTH comparáveis aos resultados obtidos em transplante não aparentado^{42,45,47}.

2.1.7 Infusão de Células e características do paciente em pós-transplante

No dia considerado zero (D0) ou dia do transplante as células são infundidas no paciente após descongelamento em caso de enxerto criopreservado ou a fresco logo após a realização de coleta do doador. O transplante é realizado através de cateter venoso implantado em veia central e a via utilizada deve ser exclusiva para infusão das células^{12,48}. O paciente deve ser devidamente monitorizado para dados

vitais devido a risco de reações durante o período de infusão do enxerto. As principais reações relacionadas ao momento do transplante são hipotensão, rubor facial, febre, anafilaxia, bradicardia ou taquicardia, dispneia, urticária, exantema, dor torácica, entre outros sinais e sintomas^{12,48}. É importante destacar que quadros de transplantes em que o doador e receptor são incompatíveis para o sistema ABO-Rh pode ocorrer reação hemolítica ainda durante a infusão das células. Imediatamente após o TCTH é, também, necessário os cuidados de monitorização para alterações fisiológicas características de reação ao enxerto^{12,48}.

Na primeira fase após o TCTH conhecida como fase de aplasia celular, o paciente apresenta o quadro de pancitopenia severa, ou seja, contagem de leucócitos, hemácias e plaquetas a valores mínimos. Este período pode durar de duas a quatro semanas até o momento em que as células doadas comecem a proliferar e serem recrutadas para a medula óssea, este momento é definido como “pega” do enxerto. O período de aplasia celular sofre influência direta do tipo de regime de condicionamento recebido pelo paciente, fonte de células e quantidade de células infundidas. A “pega” do enxerto é validada quando a contagem de plaquetas está acima de $50 \times 10^9/L$ sem o paciente receber hemotransfusão consecutivos por 7 dias e/ ou o número de neutrófilos está acima de $0.5 \times 10^9/L$ por três dias^{12,48}.

O período pós-transplante requer atenção clínica devido a possibilidade de ocorrência de complicações em curto prazo ou em período tardio. A mucosite orofaríngea e de tubo digestivo é uma complicação precoce e apresenta variação em severidade de leve a grave⁴⁹. As infecções oportunistas também são consideradas complicações relevantes e que têm impacto no sucesso do transplante quando ocorrem em período de aplasia celular. As infecções fúngicas e bacterianas são as mais frequentes e estão relacionadas com a perda de mucosa e pele causada pelo regime de condicionamento e utilização de cateteres venosos¹². As infecções causadas pelo citomegalovírus (CMV) e a Doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda são complicações graves e serão discutidas em seções posteriores.

A DECH crônica é considerada uma das mais importantes complicações tardias e se caracteriza por lesões semelhantes a reações autoimune em órgãos alvos como pele, fígado, pulmão e intestino. O tratamento dessa doença requer uso de corticoides e imunossupressores conforme gravidade dos sinais e sintomas¹².

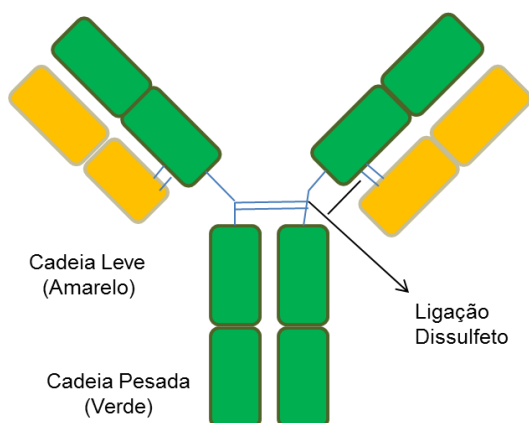
Esta breve descrição do processo de transplante e complicações relacionadas aborda de maneira geral como o procedimento de transplante é realizado. Sem dúvida, a discussão de cada item citado requer maiores detalhes para orientações de condutas de tratamento e assistência clínica nas unidades de transplantes.

2.2 Alemtuzumab

2.2.1 Propriedades Farmacológicas e Mecanismo de ação

Os anticorpos são imunoglobulinas (Ig) produzidas fisiologicamente por linfócitos do tipo B diferenciadas reconhecidos como plasmócitos. Essas moléculas são estruturas solúveis que apresentam formato em Y por agrupamento de cadeias polipeptídicas leves e pesadas unidas por ligação dissulfídrica (Figura 2). As duas cadeias leves e as duas cadeias pesadas apresentam-se idênticas entre si permitindo que o anticorpo tenha dois sítios de ligação por molécula de anticorpo²⁷.

Figura 2 - Imunoglobulina formada por cadeias leves e pesadas.



Fonte (Modificada): Murphy, K. et al. *Imunobiologia de Janeway*. Ed Artmed, 7ª edição, 2010.

As Ig são agrupadas em classes conforme variações na região C-terminal, domínios constantes das cadeias leves e pesadas. São reconhecidas cinco classes chamadas de imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina D (IgD), imunoglobulina G (IgG: IgG1, IgG2a), imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina E (IgE). As variações de função dessas classes de imunoglobulinas são definidas conforme a cadeia pesada²⁷.

O domínio V, ou variáveis amino-terminais, de cadeias leves e pesadas (V_H e V_L) é a região que permite a ligação aos antígenos e são diferentes entre os variados anticorpos²⁷. No meio do domínio V existem porções em que os aminoácidos variam em segmentos específicos chamadas de regiões hipervariáveis (HV1, HV2 e HV3) e que determinam a especificidade de ligação do anticorpo²⁷. O pareamento das regiões V_H e V_L forma o sítio de ligação para o antígeno e as seis alças hipervariáveis (HV1, HV2 e HV3) formam a chamada superfície complementar para o antígeno (regiões determinantes de complementariedade ou CDRs)²⁷. Por fim, no meio dessas regiões hipervariáveis, existe áreas de menor variabilidade entre anticorpos sendo designadas de regiões estruturais²⁷. Assim, as regiões variáveis e a conformidade espacial das regiões formam a especificidade de ligação aos diferentes antígenos.

Conhecendo a estrutura básica dos anticorpos, prosseguimos para compreender a criação de anticorpos humanizados produzidos através de técnicas de engenharia genética. Os chamados anticorpos monoclonais foram descritos por Georges J. F. Kohler e César Milstein (1975) que fizeram a técnica de fusão entre esplenócitos, previamente estimulados com a molécula ou estrutura de interesse biológico, com células de mieloma resultando nos chamados hibridomas. Essas células apresentam capacidade de produção de anticorpos com especificidade de ligação previamente conhecida associada à alta proliferação celular^{27,50}.

Após a descoberta da possibilidade de produção de anticorpos de maneira controlada, foi desenvolvido por meio da engenharia genética anticorpos humanizados através da inserção de CDRs de camundongo na molécula de imunoglobulina humana, produzindo um anticorpo de especificidade a antígeno conhecido sob a estrutura da Ig humana^{27,50}. Dessa forma, o anticorpo humanizado é constituído pela fusão de parte da cadeia constante humana com a parte de reconhecimento de antígeno de interesse farmacológico proveniente de animal. Essa técnica previne o problema de reação anticorpo humano anti-anticorpos que é

caracterizado pela produção fisiológica humana de anticorpos contra anticorpos de camundongos, gerando reações de bloqueio da ação do anticorpo de interesse e formação de reações alérgicas ao mesmo^{27,50}.

O conhecido Campath® apresenta-se em três variações, Campath-1M (IgM de rato), Campath-1G (IgG2b de rato) e Campath-1H (IgG1 humanizado), todas essas variações reconhecem o epítipo CD52 que está ancorado em molécula glicolípídica presente em membranas de linfócitos³². Esses anticorpos apresentam pequenas variações de efeito celular como, por exemplo, o Campath-1M tem função eficiente na ativação do sistema complemento e o Campath-1G também ativa sistema complemento, mas tem afinidade de ligação a receptores Fc que resulta em lise de células³².

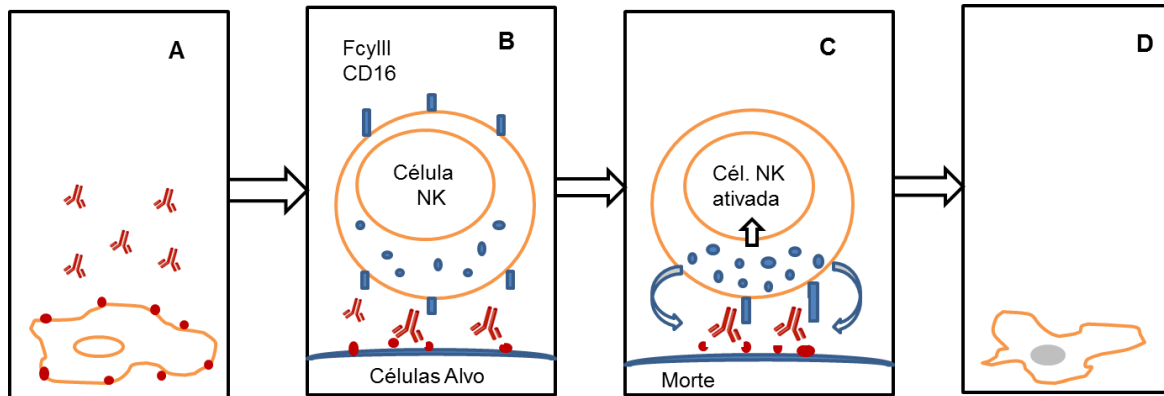
O Campath-1H, ou alemtuzumab, que é o foco deste estudo é formado por meio de inserção de CDRs específicos para o antígeno CD52 em estrutura constante de anticorpo humano. Então, o alemtuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado (região constante da Ig humana) do tipo kappa (k) IgG1 que reconhece a molécula de membrana CD52 inserida via CDRs^{7,51,52}. O uso de anticorpos monoclonais humanizados na prática clínica está em progressão devido ao benefício de especificidade de ação dos anticorpos, o que diminui o risco de efeitos adversos relacionados ao tratamento.

A molécula CD52 é uma glicoproteína ancorada na membrana plasmática por ligação ao glicophosphatidilinositol (GPI) e está presente em células como monócitos, linfócitos T e B e macrófagos^{7,53}. A ação do alemtuzumab pelo reconhecimento da CD52 resulta em depleção de linfócitos nos pacientes⁷. Uma das vias de depleção celular causada pela IgG1 anti-CD52 ocorre pelo mecanismo de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)^{7,54,55}.

Essa reação se caracteriza pela ligação do anticorpo anti-CD52 (alemtuzumab) na molécula CD52 e que resulta na exposição da região Fc da imunoglobulina para o meio externo das células em que ocorreu o reconhecimento do epítipo CD52 (linfócitos T e B, monócitos e macrófagos). Esta região Fc exposta é reconhecida por moléculas de ativação presente em células Natural Killer (NK) através de receptor FcγRIII (CD16). A célula NK é um tipo celular de origem linfóide não-B e não-T que apresenta em seu interior grânulos citoplasmático como granzimas e perforinas que são liberados ao reconhecer a região Fc da IgG1

resultando em morte da célula ligada ao anticorpo^{27,29}(Figura 3). Assim, ocorre a depleção celular, principalmente de linfócitos, associada à ação do anticorpo humano anti-CD52 (alemtuzumab).

Figura 3 - Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos.



Fonte (Modificada): Murphy, K. et al. *Imunobiologia de Janeway*. Ed Artmed, 7ª edição, 2010. Em **A**, o anticorpo se liga antígenos na superfície da células-alvo. **B**: Receptores Fc nas células NK reconhecem o anticorpo ligado. **C**: Ligação cruzada dos receptores FC sinaliza a células NK para matar a célula-alvo. **D**: células alvo morre por apoptose.

O alemtuzumab também tem a capacidade de causar citólise de células que apresentam a molécula CD52 via ativação do sistema do complemento^{51,55}. O sistema complemento é formado por proteínas plasmáticas que quando ativadas via clivagem de moléculas inativas (zimógenos) resultam em opsonização, remoção de complexos imunes, indução de reação inflamatória em resposta a patógenos e lise de patógenos e de células^{27,29}.

Além disso, o alemtuzumab apresenta atividade agonista para liberação de citocinas por linfócitos T que amplificam a resposta imune relacionada à depleção de células reconhecidas pelo anticorpo^{7,27,54,55}. Assim, o alemtuzumab resulta em depleção de células que apresentam o epítipo CD52 via citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo e ativação do sistema complemento.

A avaliação da farmacocinética do alemtuzumab foi realizada através de sua administração em pacientes portadores de LLC de células B que nunca haviam feito uso do anticorpo e eram refratários ao uso de fármacos análogos de purinas,

comumente usados para tratamento desta doença^{7,56}. Sob o critério de posologia de 3mg de alemtuzumab com aumento gradativo até 30mg, administrado por três vezes por semana e limite de 12 semanas, foi evidenciado farmacocinética de modelo bicompartimental e eliminação não linear^{7,56}. A eliminação do fármaco estaria relacionada à dose aplicada e ao número de linfócitos, ou seja, moléculas CD52 presentes nos pacientes⁵⁶.

A biodisponibilidade do fármaco é relacionada a dose aplicada e ao número de linfócitos circulantes, ou seja, a quantidade de anticorpo circulante é diretamente afetada pelo número de moléculas CD52 livres nas células dos pacientes⁵⁶. Segundo monografia deste anticorpo, o alemtuzumab apresenta meia-vida de oito horas ao ser realizado a primeira dose do fármaco e pode ser aumentada conforme a redução do receptor CD52⁷. A dose desejada de alemtuzumab deve ser administrada de maneira escalonada.

2.2.2 Indicação Clínica

O alemtuzumab tem sido indicado como anticorpo de eficácia significativa no tratamento de LLC. Pacientes com LLC de células B (LLC-B) que apresentaram refratariedade ao uso de fármacos como fludarabina apresentam boa resposta ao alemtuzumab e melhor sobrevida global associada a eliminação da doença residual mínima (DRM)^{27,55,57,58}. No tratamento da LLC também tem sido avaliada a opção de associação do alemtuzumab com a fludarabina e tem sido descrito um aumento da resposta do paciente a esse tratamento combinado sob a perspectiva de remissão da doença e grau de toxicidade controlada. Assim, pode ser considerada uma opção de indicação o uso do alemtuzumab para terapia de LLC¹⁷.

Nos casos de LLC de alto risco, ou seja, com mutação do gene p53 o alemtuzumab foi associado a maior eficácia para este grupo de pacientes, pois tem seu efeito independente do gene p53⁵⁵. A mutação no gene p53 resultaria em menor resposta a fármacos como fludarabina, pois este fármaco requer o gene p53 sem mutação para melhor efeito farmacológico⁵⁹. O uso do alemtuzumab como opção para tratamento de LLC como primeira linha também tem sido avaliado e bons resultados em eficácia foram obtidos⁵⁵.

Em outras doenças malignas também tem sido investigado os benefícios clínicos que podem ser obtidos com o uso do alemtuzumab. Doenças como linfoma não-Hodgkin (LNH) tem apresentado resposta global e/ou parcial importante quando tratadas com o alemtuzumab^{7,60}. Doenças auto-imunes também tem sido foco de investigação de eficácia do alemtuzumab como artrite reumatóide e esclerose múltipla, apresentando bons resultados de controle clínico^{7,60}.

2.2.3 Emprego no Transplante

O alemtuzumab foi introduzido aos protocolos de TCTH com os seguintes objetivos: controle da DECH aguda e crônica e prevenção de rejeição após transplante⁶¹. O emprego do alemtuzumab no TCTH em centros de transplantes do mundo tem aumentado principalmente para regime de condicionamento de baixa intensidade. O efeito do alemtuzumab em depletar linfócitos reduz risco de instalação e desenvolvimento da DECH e de rejeição porque estas células quando ativadas são capazes de induzir lesão tecidual de órgãos alvo da DECH e/ou do enxerto⁶². Além disso, como citado no item de regime de condicionamento, o alemtuzumab apresenta maior seletividade às células resultando em menor toxicidade comparada aos quimioterápicos de ação não específica.

Segundo Gandhi e colaboradores (2013), em pacientes com AA severo e com critério para TCTH, o alemtuzumab demonstrou prevenir DECH crônica associado ao bom resultado de sobrevida global quando o alemtuzumab é administrado juntamente com a fludarabina e ciclofosfamida no condicionamento do transplante¹⁹. Em regimes de condicionamento com melfalano e fludarabina, o uso do alemtuzumab também pode ser considerado como opção viável. O trabalho de Chakraverty e colaboradores (2010) demonstra que a aplicação de dose única de 30mg de alemtuzumab no regime de condicionamento de pacientes do TCTH alogênico HLA compatível e doador relacionado mantém bons resultados de mortalidade relacionada ao transplante (MRT) e da DECH. Adicionalmente, é destacado também uma melhor reconstituição imune dos pacientes que receberam esta dose de alemtuzumab, considerada reduzida em relação a outros protocolos de transplante^{63,64}.

Então, o alemtuzumab tem se confirmado como droga de escolha para uso em regimes de condicionamento no TCTH alogênico devido a significativos resultados de prevenção da instalação da DECH, sendo este o principal fator de escolha para o uso desse anticorpo^{65,66}.

2.2.2 Reações adversas e Contraindicações

O alemtuzumab pode causar efeitos adversos em período de administração, pós a primeira dose ou tardio. As principais reações são hipotensão, tremores, febre e dispneia. O tratamento a esses eventos seguem uso de anti-histamínicos, antieméticos e corticosteróides⁷.

Devido ao alto risco de eventos iniciais, a pré-medicação ou o chamado preparo do paciente é recomendada utilizando esteroides orais ou venosos associados ao anti-histamínico (difenidramina) e analgésico (paracetamol). Nos quadros mais severos com apresentação de hipotensão, neutropenia febril e dispneia aconselha-se a hidratação pela infusão de solução salinas e β 2-agonista ou esteroides⁷.

Os efeitos adversos tardios ou oportunistas estão relacionados às infecções devido ao prolongado período de reconstituição imune após o uso de alemtuzumab. Os principais patógenos relacionados às complicações infecciosas são *Pneumocystis carinii* (PPC) e *Aspergillus ssp.* causadores de pneumonia, citomegalovírus e herpes zoster. A profilaxia antinfeciosa é aconselhável desde o início do uso do alemtuzumab até o período de aumento de contagem de células CD4. Estas infecções acometem principalmente os pacientes com LLC-B quando tratados com o alemtuzumab⁷. Além disso, o alemtuzumab é contraindicado para pacientes grávidas e em período de lactação devido à possibilidade de passagem pela placenta e de ser liberado no leite materno. Pacientes com hipersensibilidade a droga e seus componentes, com infecções ativas e HIV positivos também não são elegíveis para o uso do alemtuzumab⁷.

2.3 Doença do enxerto contra hospedeiro

2.3.1 Epidemiologia e Fatores de Risco

A Doença do enxerto contra hospedeiro ou *graft-versus-host disease* (DECH ou, sigla em inglês GVHD) é uma das principais complicações do TCTH alogênico juntamente com as complicações relacionadas a toxicidade do regime de condicionamento, falha no enxerto, infecções e falência de órgãos. A DECH é responsável por 13% dos óbitos pós-transplante de doador relacionado e 14% dos óbitos em TCTH de doador não relacionado, ambos HLA idênticos⁶⁷.

A incidência da DECH pode variar conforme fatores relacionados ao transplante como o grau de compatibilidade do HLA, fonte do enxerto, tipo de doador, regime de condicionamento e fármacos usados na profilaxia da DECH^{55,67}. Disparidades no sistema HLA aumentam o risco de DECH, conforme já descrito neste trabalho. A fonte de células é associada ao risco de DECH devido a composição celular do enxerto, sendo que o TCTH com enxerto de CTP apresenta maior risco de DECH do que o transplante com enxerto de MO seguido de células do SCUP devido a maior proporção de linfócitos T nas CTP^{55,67}. Dessa forma, a depleção de células T é comumente utilizada como método de profilaxia da DECH.

O regime de condicionamento também é fator que altera o risco de DECH. A toxicidade dos fármacos e/ ou irradiação corporal total (ICT) resulta em lesão tecidual do receptor com consequente morte celular, liberação de citocinas e quimiocinas que promovem ativação e recrutamento de células importantes na instalação da DECH em órgãos alvo da doença^{67,68,68,70,71}. Por isso, é importante destacar que os RIC têm sido usados como método menos agressivo e associado a um atraso no período de desenvolvimento da DECH aguda e melhores resultados com redução de severidade da doença no pós TCTH alogênico⁷².

Por fim, a classe de fármacos utilizados para profilaxia da DECH também tem influencia direta na severidade dessa doença pós TCTH. O uso de CsA e MTX como métodos profiláticos para DECH demonstram melhores resultados de incidência e severidade da DECH quando comparado a grupos de pacientes que recebem apenas a CsA⁷³. O alemtuzumab, foco deste trabalho, também tem sido descrito

como eficiente fármaco de profilaxia de desenvolvimento da DECH⁶¹. Entretanto, estudos mais detalhados sobre o efeito do alemtuzumab na prevenção da DECH merecem atenção devido ao efeito de atraso de reconstituição imune do paciente.

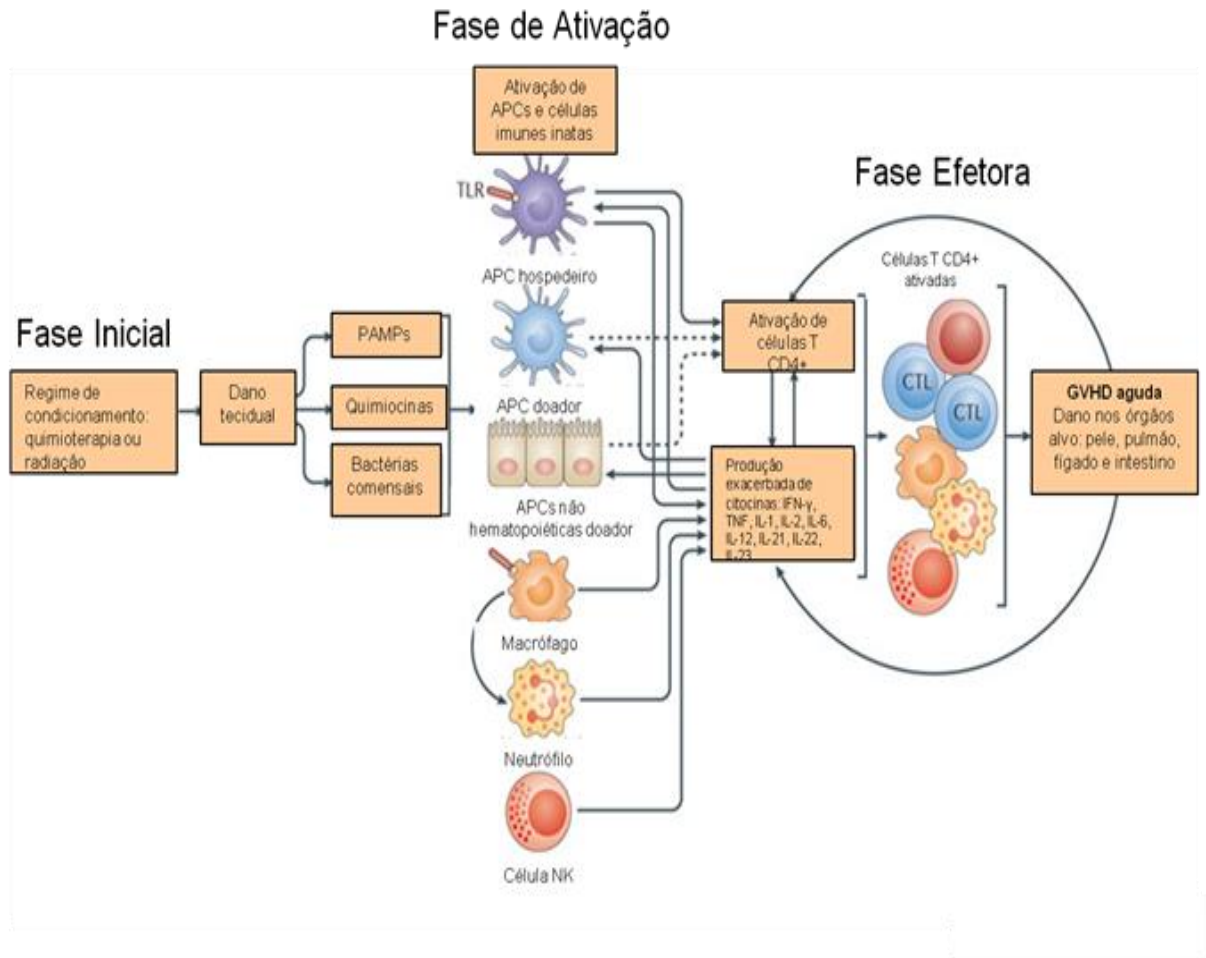
A diferença entre sexo do receptor e doador e o fator de idade avançada também são considerados fatores de risco para DECH⁷⁴. Assim, o TCTH com doadores não relacionados apresentam maior risco da DECH comparado ao TCTH alogênico com doador relacionado mesmo que HLA compatível⁷⁵.

2.3.2 Fisiopatologia

A DECH pode ocorrer como um processo agudo ou crônico e a fisiopatologia dos dois quadros se diferenciam quanto ao aspecto imunológico envolvido na instalação e desenvolvimento da doença e o tempo de aparecimento da doença. A DECH aguda é basicamente caracterizada como um processo inflamatório e a DECH crônica é evidenciada como um processo autoimune⁷⁶. Tendo em vista o foco do trabalho, as fases da DECH aguda serão mais detalhadas, no entanto, podem participar também do processo de DECH crônica quando os sinais clínicos desta doença apresenta como persistência da DECH aguda⁷⁶.

Em modelos experimentais de DECH aguda esta tem sido descrita como um processo fisiopatológico dividido em três fases consecutivas e auto estimulatórias como demonstrado na figura 4⁷⁶.

Figura 4 - Cascata da DECH aguda.



Fonte (modificada): Blazar, B. R. et al. *Advances in graft-versus-host disease biology and therapy*. Nat Rev Immunol . 2012. A fase inicial é caracterizada pelo regime de condicionamento que gera a lesão tecidual; Segunda fase da doença (fase de ativação): recrutamento de células do sistema imune inato, ativação de células T e liberação de quimiocinas e citocinas. Enfim, fase final (fase efetora), as células T ativadas se diferenciam em linfócitos T citotóxicos que liberam mediadores inflamatórios e provocam o recrutamento de leucócitos para os órgãos alvo da doença, perpetuando a resposta inflamatória. GVHD: graft-versus-host disease ou doença do enxerto contra hospedeiro.

A fase inicial ou primeira fase da DECH aguda inicia com o efeito de toxicidade do regime de condicionamento aplicado nos pacientes por meio de fármacos ou radiação no período de pré-transplante. O regime de condicionamento resulta em lesão tecidual grave principalmente no trato gastrointestinal. O dano tecidual causa rompimento da barreira tecidual e, conseqüente, translocação de

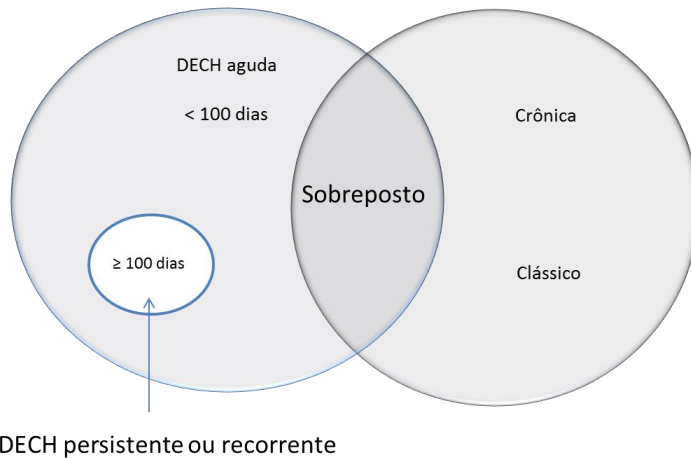
bactérias da microbiota intestinal para o sangue resultando em ativação de leucócitos via reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) circulantes⁷⁷. A lesão tecidual também resulta em produção e liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IFN- γ que apresentam funções importantes no processo de ativação de células, incluindo aquelas do sistema imune^{76,77,78}. Como descrito anteriormente, a intensidade do regime de condicionamento interfere na frequência da DECH aguda por causa do seu efeito na fase inicial de instalação do processo inflamatório que promoverá o recrutamento e a ativação de células imunocompetentes.

Na fase de ativação, como o próprio nome define, ocorre ativação de células T CD4, via reconhecimento de antígenos pelos receptores de células T (TCR) apresentados por via direta ou indireta nas APCs^{76,77,78,79}. A fase efetora da DECH aguda ocorre devido a ação dos linfócitos T ativados na produção e liberação exacerbada de citocinas com efeito inflamatório. Essas células se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs) que tem a capacidade de causar lesão direta ao tecido de órgãos alvo da doença e promovem a amplificação do processo inflamatório descrito^{76,77}.

2.3.2 Diagnóstico e Manifestação Clínica

O diagnóstico da DECH é baseado em critérios clínicos de sinais e sintomas da doença conforme o órgão acometido e grau de severidade apresentado pelos sinais da doença no paciente. A DECH aguda foi classicamente definida como uma doença com aparecimento de sinais e sintomas no período até o limite de cem dias após o TCTH alogênico e a DECH crônica clássica é descrita com sinais após os cem dias. Variações como a DECH hiperaguda ocorre antes do período de reconstituição de neutrófilos (“pega”) no receptor do enxerto^{67,80}. Quando ocorre o quadro de sobreposição de sinais entre DECH aguda e crônica define-se como DECH sobreposta^{67,80}. A DECH aguda persistente ocorre quando o paciente se mantém com os sinais e sintomas após os cem dias do TCTH alogênico mesmo que esteja em tratamento para a doença (Figura 6)^{67,80}.

Figura 5 – Ilustração da Classificação por tempo da DECH



Fonte (modificada): Pasquini, M. C. Impacto of graft-versus-host disease on survival. Best Practice & Research clinical Haematology. 2008. A DECH aguda é classificada como aguda (<100 dias após TCTH) ou recorrente/ persistente (>100 dias). DECH crônica pode ser classificada como clássica ou sobreposta em caso de persistência de sinais clínicos da DECH aguda.

Inicialmente, para diagnóstico clínico da DECH, foi criada por Glucksberg e colaboradores no ano de 1974, e revisado por Thomas e colaboradores (1975), a classificação da DECH envolvendo a graduação de pele, fígado e intestino que são os principais órgãos afetados pela doença⁸⁰. É importante destacar que o Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea (IBMTR) criou outra classificação e existem estudos que comparam a classificação de Glucksberg e IBMTR, mas a primeira mantém-se com o benefício de melhores resultados relacionados em prever sobrevida precoce apesar de IBMTR ser considerada a classificação com menor viés médico para definição da graduação da DECH^{76,81}.

Neste trabalho a classificação de Glucksberg foi usada como base para diagnóstico da DECH aguda e segue os critérios de, primeiramente, realizar o estadiamento por características de sinais na pele, fígado ou trato gastrointestinal separadamente, conforme descrito na Tabela 4. E, após o estadiamento por órgão afetado, o paciente é graduado conforme gravidade dos sinais e sintomas contemplando o acometimento de um ou mais órgãos alvo da doença sob os critérios relacionados em Tabela 5.

Tabela 4 – Estagiamento DECH aguda

ESTÁGIO	PELE	FÍGADO	TRATO INTESTINAL
Leve 1+	Rash mucopapular < 25% da superfície corporal	Bilirrubina 2 a 3mg/dL	Diarreia 500 a 1000 mL/dia ou náusea persistente
Moderado 2+	Rash maculopapular 25 a 50 % da superfície corporal	Bilirrubina 3 a 6mg/dL	Diarreia 1000 a 1500 mL/dia
Severo 3 +	Eritroderma generalizado	Bilirrubina 6 a 15mg/dL	Diarreia > 1500ml/dia
Grave 4 +	Eritroderma generalizado com formação de bolhas (vesículas >2cm) e descamação	Bilirrubina > 15mg/dL	Dor abdominal e ou íleo paralítico

Fonte (adaptada): Paton, E. J. A., Coutinho, M. A. & Voltarelli, J. C. *Diagnóstico e tratamento das complicações agudas do transplante de células progenitoras hematopoéticas*. 2000. Esta tabela resume os critérios de estagiamento da DECH aguda conforme órgão acometido pela doença.

Tabela 5 – Graduação da DECH aguda

ESTÁGIO				
GRAU	PELE	FÍGADO	INTESTINO	DÉFICIT FUNCIONAL
0 (nenhum)	0	0	0	0
1 (Leve)	+ a 2 +	0	0	0
2 (Moderado)	+ a 3 +	+	+	+
3 (Grave)	2 + a 3 +	2 + a 3 +	2 + a 3 +	2 +
4 (Risco de Vida)	2 + a 4 +	2 + a 4 +	2 + a 4 +	3 +

Fonte (adaptada): Paton, E. J. A., Coutinho, M. A. & Voltarelli, J. C. *Diagnóstico e tratamento das complicações agudas do transplante de células progenitoras hematopoéticas*. 2000. Graduação geral da DECH aguda conforme estagiamento de cada órgão previamente definido. A graduação é o resultado global da classificação de gravidade quando acometido um ou mais órgão pela doença.

Conforme citado, a pele, o fígado e o trato gastrointestinal (GI) são os principais órgãos clinicamente afetados pela DECH aguda sendo a pele o órgão mais afetado pela doença seguido do trato GI e, por fim, o fígado o órgão com menor frequência de DECH aguda⁸².

Na pele a doença pode apresentar-se como *rash* cutâneo em regiões palmar e plantar, podendo progredir por todo o corpo e em casos de maior comprometimento do órgão ocorre o aparecimento de erupção maculopapular, prurido, bolhas e, em casos mais graves, dermatite ulcerativa. O diagnóstico é feito por critérios clínicos de característica das lesões podendo ser associada à biópsia de pele^{74,77,82,83}.

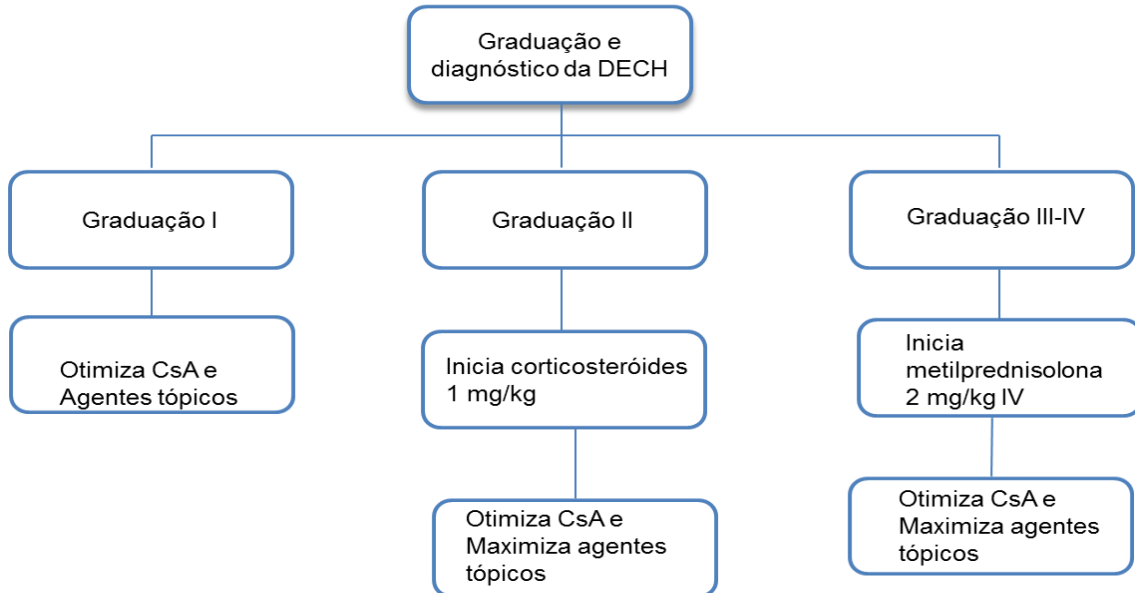
A DECH aguda que afeta o trato GI é associada ao quadro de diarreia podendo ocorrer também dor abdominal, náusea, vômito e, em casos mais graves, perda de mucosa intestinal devido ulceração do tecido. O diagnóstico clínico também tem sido a classificação do quadro clínico associado a exames de endoscopia e graduação histológica por biópsia^{74,77,82,83}.

O fígado quando sofre com o quadro da DECH aguda resulta em aumento dos níveis séricos de bilirrubina, transaminases e fosfatase alcalina. Outros sinais como hepatomegalia, urina colúrica (escura) e fezes esbranquiçadas podem ser indicativos de acometimento hepático. É importante destacar a dificuldade de diagnóstico da DECH de fígado devido a associação destes sinais clínicos a outras doenças relacionadas ao fígado como Doença veno-oclusiva hepática (VOD)^{74,77,82,83}.

2.3.3 Tratamento

O tratamento da DECH aguda ainda tem os corticosteroides como principais fármacos e são considerados de primeira linha para essa doença. A DECH de graduação 1, ou seja, acometimento apenas da pele tem sido tratada com esteroides de aplicação tópica. O uso de corticosteroides oral ou EV tem indicação a partir da graduação 2 da DECH aguda associado a aumento de dose de CsA quando em uso no paciente em pós transplante. A dose de metilprednisolona pode ser aumentada quando o paciente é graduado em DECH 3-4 (Figura 6). Destaque para os efeitos colaterais, como aumento do risco de infecção, com o uso dos corticosteroides que são uma das principais preocupações no pós-transplante⁸².

Figura 6 – Algoritmo de tratamento DECH aguda



Fonte: Dignam, F. L. et al. *Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease*. British Journal of Haematology. 2012.

A refratariedade de uso a corticosteroides para o tratamento da DECH também configura uma importante preocupação clínica devido à necessidade de controle dessa doença. Alguns estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de verificar efeitos de outras classes de fármacos para controle de DECH refrataria. Por exemplo, pode ser citado a ATG, anticorpos monoclonais como anti-TNF α (infliximab), anti receptor de IL-2 (daclizumab) e anti-CD52 (alemtuzumab) e o uso de células mesenquimais^{84,85,86}.

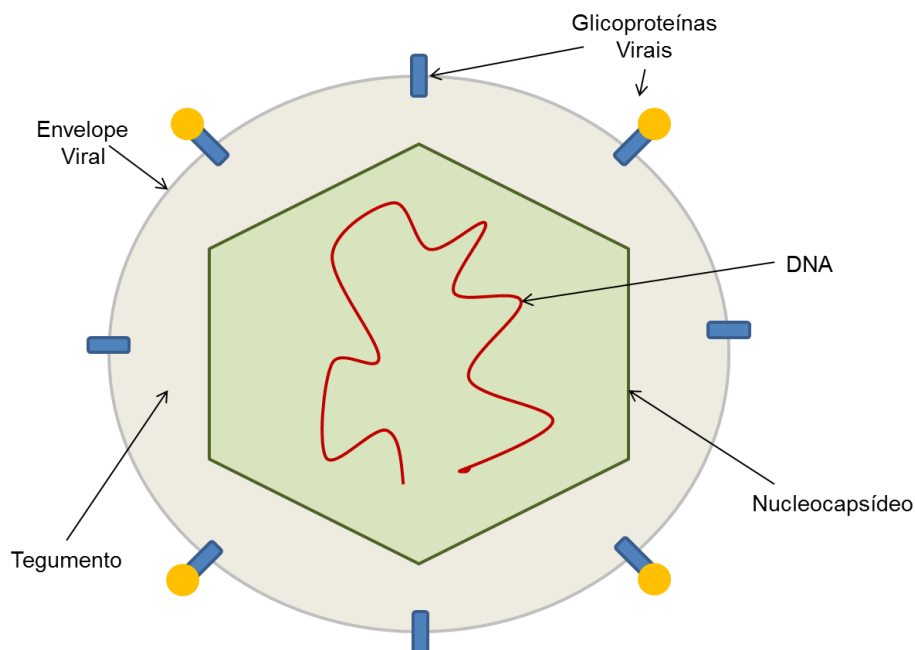
O controle da DECH de grau elevado é difícil e por isso as pesquisas para uso de métodos profiláticos tem alto valor clínico. O alemtuzumab, foco deste trabalho, foi investigado como método de prevenção de desenvolvimento da DECH aguda, apesar de também ser considerado fármaco de escolha para tratamento dessa doença.

2.4 Citomegalovírus

2.4.1 Biologia Molecular e Clínica

O citomegalovírus (CMV) é um vírus da família *Herpesviridae* que é a família de vírus com maior relevância clínica nos pacientes de TCTH¹⁸. Nesta família de vírus também se incluem os vírus herpes simplex (HSV), Epstein Barr (EBV), herpes-vírus humano 6 (HHV-6) e o varicela-zoster (VZV)¹⁸. O CMV é um DNA vírus e é classificado como β -herpesvirus devido a estrutura composta por envelope com glicoproteínas virais, tegumento, nucleocapsídeo e DNA viral (Figura 7)⁸⁷.

Figura 7: Representação esquemática do citomegalovírus



A infecção celular pelo CMV ocorre por vias de sinalização entre o vírus e receptores de células. Resumidamente, o CMV interage com a superfície da célula via ligação de glicoproteínas virais com constituintes celulares como proteoglicanos de Heparan Sulfato (HSPGs). A internalização do vírion (partícula viral constituída

por DNA e capsídeo) ocorre também através de interações moleculares^{18,87}. A infecção pelo vírus é definida com a detecção do CMV ou proteínas virais em amostras de plasma, urina ou tecido⁹⁷. Em geral, quando o paciente é infectado pelo CMV não ocorre o aparecimento de sinais ou sintomas, o que contrasta com a doença causada pelo CMV⁹⁷.

Após infecção, a resposta celular do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro que direciona o processo de replicação do vírus e aparecimento de doença. Por exemplo, podemos citar trabalhos que destacam que a deficiência de células NK está associada com o quadro de doença por CMV severa⁸⁸e a restauração dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são correlacionadas ao controle do vírus após o TCTH⁸⁹.

O CMV apresenta capacidade de se manter em estado de latência que é caracterizado pela manutenção do DNA do vírus na célula, mas sem expressão do gene. Este estado de latência é reversível⁸⁷. Estudos têm demonstrado que as células de progenitor mielóide são as principais células envolvidas em manter o vírus latente, porém o vírus pode infectar diversos tipos celulares¹⁸. A reativação do vírus ocorre em situação de perda de controle do sistema imune contra a replicação do vírus (ação mediada por linfócitos T) ou por processo de mudança na atividade celular que abriga o CMV⁸⁷.

A reativação do CMV não se correlaciona diretamente com o aparecimento de sinais clínicos da doença causada por este vírus¹⁸. A doença causada pelo CMV é definida com a detecção do vírus por um ou mais testes diagnóstico associado ao quadro de sintomas no paciente e/ou sinais em órgãos afetados pelo vírus⁹⁷. O quadro de imunodeficiência que ocorre principalmente em pacientes transplantados e portadores de doenças que causam imunodeficiência é o principal fator relacionado ao aparecimento de doença por CMV¹⁸.

A presença de vírus latente é detectada pela presença de anticorpos que são produzidos após soroconversão em período de infecção primária. A infecção ativa é detectada por marcadores baseados em antígenos do vírus como pp65. Para a detecção da infecção ativa é realizado exames de antigenemia que detecta pp65 via exames de imunofluorescência direta com uso de anticorpos para pp65 e também são realizados testes de PCR.

2.4.2 Epidemiologia e Fatores de Risco

A prevalência do CMV na população geral é relativamente alta e a doença causada pelo vírus é mais comum em pacientes imunossuprimidos como os submetidos ao TCTH¹⁸. Nos Estados Unidos da América (EUA) a soroprevalência do CMV é de, aproximadamente, 50%¹⁸ e em países em desenvolvimento (ou subdesenvolvidos) como o Brasil a prevalência do vírus pode chegar a 90% da população geral³⁸.

A imunossupressão dos pacientes de TCTH é principal fator de risco para doença causada por CMV sendo o período entre o transplante e a “pega” do enxerto a fase de maior risco para reativação do vírus⁹⁰. Após pega do enxerto, a associação de baixa contagem de linfócitos T e/ ou desordens na função destas células resultam também no aumento do risco para 60-70% de infecção por CMV em pacientes soropositivos ou pacientes soronegativos que receberam enxerto positivo para CMV⁹⁰. Destaque para a importância da soropositividade para CMV do receptor no TCTH e uso de corticosteroides para o risco de desenvolvimento de doença por CMV¹⁸.

A introdução de estratégias de prevenção de doença causada por CMV através dos testes de detecção do vírus (antigenemia para antígeno pp65 e testes de PCR- Polymerase Chain Reaction) associada ao emprego do tratamento preemptivo com antivirais tem reduzido significativamente a frequência de doença causada por CMV ^{18,94}.

A doença tardia causada pelo CMV é, atualmente, uma importante preocupação clínica devido a alta incidência resultante de ausência de resposta imune específica ao CMV, antigenemia positiva para o vírus no período de cem dias após TCTH e apresentar DECH crônica^{88,90}.

2.4.3 Diagnóstico e Manifestação Clínica

O diagnóstico de doenças causadas por CMV é realizado através de presença de sinais e sintomas associado a exames de antigenemia ou PCR positivos em

pacientes submetidos ao TCTH. O exame de antigenemia é o teste usado na rotina na unidade de transplante do HC-UFMG devido ao alto custo do PCR.

A antigenemia consiste em teste de imunofluorescência com uso de anticorpos que detectam antígeno pp65 do vírus em leucócitos do sangue periférico^{93,98}. Este exame tem baixa sensibilidade para detecção precoce de CMV nos pacientes em período de aplasia celular que corresponde a fase em que não ocorreu a “pega” do enxerto⁹⁸. Os exames de antigenemia são realizados semanalmente após o dia de infusão das células (D0) até cem dias (D+100) após o TCTH para efeito de controle de infecção e reativação do CMV e início da terapia com antivirais.

A pneumonia é a doença causada pelo CMV com pior prognóstico nos pacientes de TCTH e a doença gastrointestinal é a mais frequente neste grupo de pacientes^{18,97}. Podemos citar também como frequência alta neste grupo de pacientes as rinites, encefalites e hepatite causada por este vírus¹⁸.

A pneumonia causada por CMV pode ser detectada com exames adicionais de lavado broncoalveolar (BAL) e exame de imagem (Rx) do pulmão⁹⁵. Os sinais relacionados à doença são a hipóxia e alterações radiológicas¹⁰⁹. Destaque para o difícil diagnóstico devido a possibilidade de ocorrer alterações pulmonares causadas por radiação, quimioterapia, neoplasia metastática e edema pulmonar entre outros fatores^{95,96}.

A doença gastrointestinal causada por CMV é caracterizada por úlceras no esôfago, estômago e intestinos delgado e grosso⁹⁵. As manifestações clínicas da doença se correlacionam com essas lesões sendo a diarreia um importante sinal clínico⁹⁵. A DECH aguda intestinal e a doença gastrointestinal causadas pelo CMV apresentam em comum a diarreia como principal sinal clínico.

2.4.4 Tratamento

O paciente submetido ao TCTH é monitorado para infecção e/ ou reativação de CMV com exames de antigenemia e em caso de positividade do exame o

paciente recebe o tratamento preemptivo que é o tratamento precoce com antivirais antes do aparecimento dos sinais e sintomas relacionados a doença causada pelo vírus^{18,95}. O tratamento preemptivo reduziu significativamente a incidência de doença causada por CMV após TCTH^{97,99}.

O ganciclovir tem efeito inibitório da replicação do DNA do vírus de CMV e é fármaco de escolha para o tratamento preemptivo. Comumente usado na dose de 5mg/Kg em terapia de “indução” por período de tempo de sete dias¹⁸. O ganciclovir tem sido associado a bons resultados em prevenção de infecção e doença por CMV, porém o efeito na sobrevida não é demonstrado. A justificativa desse resultado está relacionada ao aumento da frequência de doença tardia por CMV⁹⁷.

Em pacientes que desenvolvem doenças por CMV o ganciclovir e o foscarnet são alguns dos antivirais disponíveis para o tratamento¹⁸. Destacamos o efeito de neutropenia do ganciclovir que pode acarretar maiores prejuízos relacionados ao enxerto do paciente submetido ao TCTH. O foscarnet não está disponível no Brasil HC-UFG, mas tem sido usado como fármaco de escolha em algumas unidades de transplantes no mundo⁹⁵.

3. JUSTIFICATIVA

O TCTH é uma opção terapêutica importante para doenças hematológicas malignas e não malignas e a instalação da DECH aguda grave e de doenças causadas pela infecção/ reativação por CMV podem comprometer o sucesso deste tratamento. Dessa forma, as pesquisas que avaliam fármacos que são usados em protocolos de transplantes de células e que interferem na instalação e desenvolvimento dessas morbidades pós TCTH tem relevância científica e clínica.

A inclusão do anticorpo alemtuzumab ao protocolo do regime de condicionamento do TCTH alogênico no serviço de transplantes do HC- UFMG é recente e não existem estudos que analisaram o efeito deste fármaco nos pacientes atendidos no HC-UFMG ou em outras unidades de transplantes do Brasil.

O presente estudo se justifica pela necessidade de avaliação da inclusão do alemtuzumab nos pacientes submetidos ao TCTH alogênico sob a perspectiva da incidência da DECH aguda e infecção/ reativação de CMV.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a inclusão do alemtuzumab no protocolo do regime de condicionamento do TCTH alogênico do HC-UFMG sob a perspectiva epidemiológica e clínica de instalação e desenvolvimento da DECH aguda e reativação de CMV.

4.2 Objetivos Específicos

- Descrever perfil da população submetida ao TCTH alogênico no Hospital das Clínicas da UFMG no período de Janeiro de 2009 a dezembro 2011.
- Descrever frequência de DECH aguda e infecção/ reativação de CMV.
- Avaliar incidência cumulativa da DECH aguda e infecção/ reativação de CMV nos cem primeiros dias após TCTH alogênico.
- Avaliar o alemtuzumab na incidência da DECH aguda e infecção/ reativação de CMV nos primeiros cem dias após TCTH alogênico.
- Avaliar mortalidade relacionada ao transplante nos primeiros cem dias após TCTH.
- Avaliar sobrevida em um ano pós TCTH correlacionada ao uso do alemtuzumab.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Formato do Estudo Clínico

Trata-se de um estudo Prospectivo Observacional Concorrente - Estudo de Coorte.

No período de janeiro de 2009 a dezembro de 2011 foram incluídos os pacientes submetidos ao TCTH alogênico na Unidade de Transplante do HC-UFG. Uma população total de 57 pacientes foram incluídos no estudo após consentimento livre e esclarecido. A única restrição de inclusão ao estudo é o transplante autólogo.

Os pacientes foram acompanhados do dia zero do transplante (D0) ao dia cem (D+100) após TCTH alogênico e foram avaliados quanto ao aparecimento de sinais e sintomas relacionados à DECH aguda. Além disso, foi acompanhado resultados de exame de antígeno para diagnóstico de infecção/ reativação de CMV.

A Coleta de Dados foi realizada através de acompanhamento de avaliação clínica no serviço, checagem de registros em prontuários e revisão de exames laboratoriais como teste de antígeno pp65. Neste trabalho foi considerado positivo para antígeno resultados com mais de 1 célula positiva para 100.000 células analisadas e a DECH aguda foi classificada conforme o sistema de graduação descrito por Gluksberg e colaboradores (1974) e revisada por Thomas e colaboradores (1975) apresentando maior valor preditivo da doença.

5.2 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa obedece à resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 196/96, no período vigente, e que foi revogada pela resolução nº 466 em dezembro de 2012 que dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Em 2009 este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de

Minas Gerais (Parecer n°. ETIC 208/09) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG.

5.3 Análise Estatística

Os dados relacionados ao transplante e aos sinais clínicos da DECH aguda de cada paciente foram coletados e catalogados individualmente em impressos (Anexo 1 e Anexo 2) criado para a pesquisa. Os dados foram compilados em planilha no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (spss) para análise de frequências e sobrevida. As frequências e os números absolutos relacionados às variáveis do transplante foram descritos para perfil de características dos pacientes e avaliação de fatores de risco para o desenvolvimento da DECH aguda e infecção/reativação de CMV.

As variáveis categóricas foram avaliadas através de teste qui-quadrado e considerado significância para $p < 0.05$. A probabilidade de sobrevivência foi calculada através do estimador de kaplan-meier, considerado o intervalo de confiança (IC) de 95%, teste de significância Log rank ($p < 0.05$). Para estimar incidência de DECH aguda, reativação por CMV e mortalidade relacionada ao transplante foi realizada incidência cumulativa com risco competitivo (teste de Fine e Gray).

6. RESULTADOS

6.1 Artigo

ALEMTUZUMAB AS GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE (GVHD) PROPHYLAXY STRATEGY IN A DEVELOPING COUNTRY: LOW RATE OF ACUDE GVHD BUT AN INCREASED RISK OF CMV REACTIVATION AND NO IMPACT IN SURVIVAL

CAROLINA BRAGA DE RESENDE¹; GUSTAVO MACHADO TEIXEIRA²; BARBARA MAXIMINO REZENDE¹; PRISCILA T. T. BERNARDES¹; MAURO MARTINS TEIXEIRA³; VANESSA PINHO¹; HENRIQUE BITTENCOURT⁴.

1 Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

2 Unidade de Transplantes e Serviço de Hematologia, Hospital das Clínicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

3 Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG, Belo Horizonte, MG.

4 Hemato-Oncology Division, C.H.U. Sainte-Justine, University of Montreal, Canada.

ABSTRACT

Acute GVHD (AGVHD) and CMV reactivation are important complications of alloHSCT. In this prospective cohort study conducted in the transplantation unit of the HC-UFG, Brazil, from January 2009 to December 2011, the effect of alemtuzumab on the incidence of AGVHD and CMV reactivation (at 100 days) and overall survival (at one year) after alloHSCT were evaluated. Fifty-seven patients underwent alloHSCT were included. Alemtuzumab was administered before conditioning at a dose of 1mg/kg in children (maximum of 40 mg) and 30mg/ day for 2 days in adults or children with more than 40 kg (a total of 60mg). Forty-five (78.9%) patients had a diagnosis of a malignant disease. Alemtuzumab was used before the conditioning regimen in 23 (40.4%) patients, of whom 17 received a RIC conditioning. Eleven patients presented AGVHD (grades 2-4) and were reported in only one patient when alemtuzumab was used before the conditioning. The cumulative incidences of AGVHD (grades 2-4) at 100 days for patients receiving or not alemtuzumab before the conditioning regimen were 4.3% and 29.4%, respectively ($p = 0.02$). Cumulative incidence of CMV reactivation at D+100 for patients receiving or not alemtuzumab was 61.5% and 32.6%, respectively ($p=0.02$). Sixteen deaths occurred in first 100 days after alloHSCT. Only two (12.5%) deaths were reported as caused by AGVHD and nine (56.5%) deaths caused by sepsis. Overall survival (OS) at one year was 50%. Alemtuzumab do not impact in OS. Alemtuzumab effectively control AGVHD but significantly increases the risk of CMV reactivation and do not improve OS. Our result might be useful to discuss adaptations of AGVHD prevention protocol with alemtuzumab according to transplant conditions and profile of patients underwent alloHSCT. Furthermore, we emphasize the importance of CMV in patients underwent alloHSCT in Brazil, especially in patients receiving alemtuzumab, and the need for effective strategies to prevent and monitoring CMV reactivation.

Keyword: Hematopoietic stem cell transplantation. Alemtuzumab. Graft-versus-host disease. Cytomegalovirus.

Introduction

Acute graft-versus-host disease (AGVHD) and infection/reactivation of cytomegalovirus (CMV) are important complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). Acute GVHD is reported in up to 32% in related and up to 52% in unrelated alloHSCT [1, 2]. Primary CMV infection occurred in 30% of seronegative patients transplanted with a seropositive graft and CMV disease occurred in up to 20% in patients without prophylaxis or preemptive treatment [3, 4]. CMV pneumonia results in high mortality after HSCT [3, 5].

Alemtuzumab is a monoclonal antibody that recognizes the antigen CD52, a glycoprotein found in peripheral bloodstream cells, such as lymphocytes, monocytes, macrophages and some dendritic cells. It has been increasingly used, specially in low intensity allo-HSCT [6, 7, 8]. Alemtuzumab use, as part of the conditioning regimen, has been investigated due to its depletion effect in immunocompetent T-lymphocytes and for its characteristic long half-life in bloodstream, lasting even for weeks after its administration [9, 10]. Mechanisms involved in alemtuzumab immunosuppression are not fully understood, but one of its well-known effects is the lysis of B and T lymphocytes, through complement system activation, natural Killer cells (NK) and macrophages [7, 8, 9].

Many alloHSCT factors, such as graft source, HLA compatibility, conditioning regimen, among other factors, may increase the risk of occurrence and the severity of AGVHD and/or CMV reactivation [7, 11, 12].

We have previously shown that, using a conventional prophylaxis of cyclosporine and methotrexate, incidence of grade 2-4 AGVHD was higher within our patients, resulting in a higher than expected transplanted-related mortality. In order to reduce incidence of AGVHD and TRM, we started to use alemtuzumab for patients with non-malignant diseases, for unrelated alloHSCT and for patients with a higher risk of TRM, mainly older patients [13].

Thus, the present prospective cohort study aims at assessing the effect of alemtuzumab as a strategy to decrease acute GVHD incidence and its effect on CMV reactivation and overall survival of patients undergone alloHSCT.

2. Methods

Study design

This was a prospective cohort study, conducted from January 2009 to December 2011 at the transplantation unit of the Hematology Division, at Hospital das Clínicas of the Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), a 500-bed general university hospital in southeast Brazil. The study population consisted of 57 patients, 34 (59.6%) male, and 23 (40.4%) female, with a median age of 24 (2-56) years. Patients were included in this study after signing an informed consent, regardless of age and other factors. All patients were followed up from the day of transplantation (day 0) to day +100 after alloHSCT, and were monitored as to the onset for signs or symptoms of AGVHD and CMV monitoring.

Definitions and study endpoints

For the purposes of this study, conditioning regimen was considered as myeloablative when a total oral dose of busulfan (Bu) of more than 10mg/kg were used alongside with cyclophosphamide. All other conditioning regimen were considered as reduced intensity conditioning (RIC - e.g. cyclophosphamide alone, fludarabine and mephalan, etc.).

Graft-versus-host prophylaxis included the combination of a calcineurin inhibitor (cyclosporine or tacrolimus) with or without methotrexate or micophenolate mofetil. For patients with a higher risk of aGVHD, non-related donor, or with non-malignant conditions (such as severe aplastic anemia), intravenous alemtuzumab was administered before conditioning at a dose of 1mg/kg in children (maximum of 40 mg) and 30mg/ day for 2 days in adults or children with more than 40 kg (a total of 60mg).

HLA high resolution typification was used and a donor-recipient pair was considered as match with presence of full compatibility in HLA-A, B, C and DRB1 locus (8/8 match). All donor/recipient pairs not fulfilling this criteria were considered as mismatch.

AGVHD was scored according to the grading system described by Glusksberg et al (1974) and revised by Thomas et al (1975). [14, 15, 16]. AGVHD was diagnosed

through clinical signs and graded according to the organ affected. Liver, gastrointestinal tract and skin were all graded 0 to 4 according to the onset of the first signs and the severity of the disease. The overall grading and association of the organs affected by acute GVHD was conducted following the aGVHD consensus criteria and scored according to the following grades: absent or mild (0 to 1) and moderate to severe (2 to 4).

CMV monitoring with pp65 antigenemia assay was performed through identification of the pp65 testing antigen in blood cells, via antigen- antibody reaction and were obtained on a weekly base in engrafted patients, under the criteria of platelet count above $50 \times 10^9/L$ and/ or neutrophil count above $0.5 \times 10^9/L$. A cut-off of more than 1 pp65 positive cell per 100,000 analyzed cells were considered as positive. PCR was not performed for CMV diagnosis, in spite of its higher sensitivity for diagnosis due to lack of infrastructure to perform.

Statistical methods

Incidence rate and frequency of alloHSCT-related variables were described in order to group and profile the patients according to their characteristics and assessment of risk factors for development of acute GVHD and CMV reactivation. Categorical variables were assessed through chi-square or Fisher exact test (when indicated). Overall survival probability was calculated through Kaplan-Meier estimator and differences between variables were analyzed using the log rank test. Cumulative incidence of acute GVHD incidence, and CMV reactivation with death as a competitive risk were analyzed using the Fine and Grey's test. SPSS version 15.0 and S-Plus version 6.1 were used in this analysis. All test with a $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

Patients and transplant characteristics

From January 2009 to December 2011 a total of 95 allogeneic HSCT were performed at the Transplant Unit of HC-UFMG. Among those, 57 patients were included, after informed consent. The patient and transplant characteristics are displayed in table 1. Thirty-eight patients were not included in this study. The main

reason for non-inclusion was denied to sign the informed consent (by patient or parents).

A total of forty-five (78.9%) patients had a malignant disease. Twelve (21.1%) have a non-malignant disorders, mainly severe aplastic anemia that account for 10 (17.5%) patients. The predominant conditioning regimen was the association of myeloablative doses of busulfan and cyclophosphamide in 35 (61.4%) patients. Twenty-two (38.6%) patient undergoing a RIC regimen. Alemtuzumab was used before the conditioning regimen in 23 (40.4%) patients, of whom 17 received a RIC conditioning.

GVHD prophylaxis therapy consisted of the combination of cyclosporin and methotrexate (MTX) in 44 (77.2%) patients and cyclosporine alone was used in 11 (19.3%) patients.

Acute GVHD

Acute GVHD (AGVHD) occurred in 15 (26.3%) patients. As expected, most patients had skin and/or gastrointestinal AGVHD. Eleven patients presented a grade 2-4 AGVHD. Grade 2-4 AGVHD cumulative incidence rate was 19.3% at D+100 (Figure 1). There were 5(8.9%) and 8(14.1%) cases of cutaneous and gastrointestinal grade 2-4 AGVHD, respectively.

Grade 2-4 AGVHD was presented in only 1 (1.7%) patient when alemtuzumab was used before the conditioning regimen, while 10 (17.5%) cases were diagnosed in patients not receiving alemtuzumab ($p < 0.05$ - Table 2).

The cumulative incidences of grade 2-4 AGVHD at D+100 for patients receiving or not alemtuzumab before alloHSCT was 4.3% and 29.4%, respectively ($p = 0.02$ - Figure 2).

CMV Reactivation

Forty six (81%) out of the 57 patients had been tested by the pp65 antigenemia assay. The 11 patients not tested includes nine patients that had died before engraftment and 2 patients that the assay was not performed.

Twenty three (50%) of the 46 tested patients presented a positive antigenemia for CMV. Cumulative incidence of a positive pp65 antigenemia assay after transplant was 44.3% at D+100 (Figure 3). Use of alemtuzumab before conditioning significantly influenced the incidence of CMV reactivation after alloHSCT. Cumulative incidence of CMV reactivation at D+100 for patients receiving or not alemtuzumab was 61.5% and 32.6%, respectively ($p=0.02$ – Figure 4).

Transplant-related mortality and survival

Sixteen deaths occurred in first 100 days after alloHSCT. These deaths, only 2 (12.5%) deaths reported as caused by AGVHD and 9(56.5%) deaths caused by sepsis. The other 5 (31.0%) deaths were caused: 1 relapse; 1 severe acute respiratory syndrome (SARS); 1 cerebral vascular accident (AVC) hemorrhagic; 1 veno-occlusive disease (VOD); 1 with other complication of alloHSCT.

The overall survival (OS) at one year was 50% (Figure 5). Alemtuzumab did not impact in OS (57% and 47% for patients receiving or not alemtuzumab, respectively - Figure 6, $p=0.4$).

Discussion

In the present study, we described the effects of AGVHD prophylaxis with alemtuzumab in patients underwent alloHSCT in a developing country. Our major findings are as follows: (1) the cumulative incidence of AGVHD (grades 2- 4) and AGVHD related-death were significantly reduced in patients who received alemtuzumab. However, (2) CMV events was significantly higher in patients who received alemtuzumab and alloHSCT independently of GVHD development. There was no impact of alemtuzumab in overall survival.

AGVHD and CMV infection/disease are two of the major complications of alloHSCT. AGVHD is cause of death in up to 14% of unrelated alloHSCT [11]. In the transplantation unit of HC-UFGM, alemtuzumab given before conditioning regime effectively reduced AGVHD (grades 2- 4) comparing to our historical control and also to patients not receiving alemtuzumab. Recent studies showed a decrease in risk of developing AGVHD in patients treated with alemtuzumab when compared to patients receiving antithymocyte globulin (ATG) or standard prophylactic drugs such as cyclosporine/tacrolimus and metrotexate (MTX) [7, 9, 17, 18, 19].

Our data are consistent with previous data and show that treatment with alemtuzumab is relevant to prevent AGVHD development and AGVHD related-death in alloHSCT transplanted patients from developing countries centers. However, although this treatment has benefit to control of AGVHD, the use of alemtuzumab has been questioned due to increase of number of infection by CMV after alloHSCT due to a prolonged immunologic reconstitution period after transplant [7, 17, 24]. Moreover, the higher prevalence of CMV in developing countries, comparing to developed ones, is a reason for caution in the use of drugs that increase the risk of CMV after alloHSCT. As an example, prevalence of CMV seropositivity in southern of Brazil is 96% in adults [25, 26].

Alemtuzumab, according to dose used, can be detected in the patient's bloodstream up to 56 days after the administration, resulting in a longer period of immunosuppression and susceptibility to infections [9, 27]. The optimal recommended dose of alemtuzumab for alloHSCT is a point of discussion. Most studies have used doses superior to the one used in this study [7, 28, 18]. However, total dose lower than 60mg in adults has been described as effective control of AGVHD and also associated with an improvement in immune reconstitution in patients submitted to unrelated allo-HSCT [19, 29]. In addition, this dose seems to be effective to control CMV reactivation [30].

In cases of high risk of CMV reactivation administration of prophylactic antiviral drugs in pre-transplantation have been considered effective to control CMV reactivation [31]. However, this strategy is associated with a higher cost, late CMV disease and delayed hematopoietic recovery due antiviral chemotherapy resistance and toxicity [4, 32, 33]. The most used strategy to control CMV reactivation is preemptive treatment associated monitoring of virus through antigenemia assay and/or PCR. These methods allow early identification of infected cells by viruses and may guide the use of preemptive treatment with antiviral drugs such as ganciclovir or foscarnet. Quantitative PCR have been increasingly used replacing antigenemia since it is more sensible and does not have the limitation of the number of neutrophils in blood, allowing detection of CMV before engraftment. Unfortunately, at HC-UFG, quantitative PCR is not available as a routine procedure for CMV control after alloHSCT, resulting in delay and/or lack of CMV quantification for patients with long periods of cellular aplasia. Use of quantitative PCR for CMV detection in

patients receiving alemtuzumab could improve identification of CMV and allow early preemptive treatment, resulting in less morbidity and mortality.

This is the first study describing the use of alemtuzumab as a prevention of AGVHD in Brazil. This cohort, despite the small number of patients, shows that alemtuzumab effectively control AGVHD but significantly increases the risk CMV reactivation and no improved overall survival. Our result might be useful to discuss adaptations of AGVHD prevention protocol with alemtuzumab according to transplant conditions and profile of patients underwent transplant. Furthermore, we emphasize the importance of CMV in patients underwent alloHSCT in Brazil, especially in patients receiving alemtuzumab, and the need for effective strategies to prevent and monitoring CMV reactivation.

Bibliography:

- 1 Choi, S.W. et al. *Pathogenesis and management of Graft-versus-Host disease*. Immunol Allergy Clin North Am. 2010, 30: 75-101.
- 2 Michael B., W. Garrett N., Genovefa P., Robert R., John R. W., John Z.. *Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Current Status, Known Challenges, and Future Strategies*. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2003, 9: 543-558.
- 3 Ljungman, P. et al. *Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients*. Hematol Oncol Clin North Am . 2011, 25(1):151–169.
- 4 Hakki, M. et al. *Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation*. Blood. 2003, 102(8):3060-3067.
- 5 Boeckh, M. and Ljungman, P. *How I treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients*. Blood. 2009, 113(23): 5711-5719.
- 6 Enblad, G. et al. *A pilot study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) therapy for patients with relapsed or chemotherapy-refractory peripheral T-cell lymphomas*. Blood. 2004, 103(8): 2920-2924.
- 7 Poire, X. & Besien, K. *Alemtuzumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. NIH Public access. 2011, 11(8): 1099-1111.
- 8 Bayer HealthCare. *Alemtuzumab, Campath®*.
- 9 Morris EC, Rebello P, Thomson KJ, et al. *Pharmacokinetics of alemtuzumab used for in vivo and in vitro T-cell depletion in allogeneic transplantations: relevance for early adoptive immunotherapy and infectious complications*. Blood. 2003, 102(1): 404–6.
- 10 Gandh, S. et al. *Allogeneic stem cell transplantation using alemtuzumab-containing regimens in severe aplastic anemia*. Int J Hematol. 2013, 97(5): 573–580.

- 11 Pasquini, M.C. *Impact of graft-versus-host disease on survival*. Best Practice e Reserch Clinical Haematology. 2008, 21(2): 93-204.
- 12 Appelbaum, R. Frederick et all. *Thomas` hematopoietic cell transplantation*. 4^a ed. Willey blackwell. 2004.
- 13 Bittencourt, H. et al. *A retrospective comparison of allogeneic peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation*. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2009, 2(1): 272-7.
- 14 Cahn, J.Y. et al. *Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: joint Societé Française de Greffe de Moelle et Therapie cellulaire (SFGM-TC), Dana farber cancer institute (DFCI), and International Bone Marrow transplant registry (IBMTR) prospective study*. Blood. 2005, 106(4): 1495-1500.
- 15 Weisdorf, D.F. et al. *Prospective Grading of Graft-versus-Host Disease after Unrelated Donor Marrow Transplantation : A grading algorithm versus blinded expert panel Review*. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2003, 9(8): 512-518.
- 16 Vigorito, A.C. et al. *Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD*. Blood. 2009, 114(3): 702-708.
- 17 Soifer, R.J. et al. *Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem celltransplantation for hematologic malignancies*. Blood. 2011, 117(25): 6963-6970.
- 18 Norlin, A.C. & Remberger, M. *A comparison of Campath and Thymoglobulin as part of the conditioning before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. European Journal of Haematology. 2011, 86(1): 57–66.
- 19 Chakraverty, R. et al. *Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation:*

- pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. Blood. 2010, 116(16): 3080-3088.*
- 20 Gandhi, S. et al. *Allogeneic stem cell transplantation using alemtuzumab-containing regimens in severe aplastic anemia. Int J Hematol. 2013, 97(5): 573–580.*
- 21 Poiré, X. et al. *Allogeneic stem cell transplantation with alemtuzumab-based conditioning for patients with advanced chronic myelogenous leucemia. Leuk Lymphoma . 2009, 50(1): 85–91.*
- 22 Hale, G. *Cd52 (Campath1). J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2001, 15(4) : 386–391.*
- 23 Mohan, S.R. et al. *Therapeutic implications of variable expression of CD52 on clonal cytotoxic T cells in CD8+ large granular lymphocyte leukemia. Hematologica. 2009, 94(10): 1407-1414.*
- 24 Chakrabarti, S. et al. *High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. Blood. 2002, 99(12): 4357-436.*
- 25 Souza M. A. , et al. *Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2010, 43(4): 359–361.*
- 26 Boeckh, M. & Geballe, A. P. *Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. The Journal of Clinical Investigation. 2011, 121(5): 1673–1680.*
- 27 Siegal, D. et al. *Graft-versus-host disease following marrow transplantation for aplastic anemia diferente impacto of two GVHD prevention strategies. Bone Marrow Transplantation. 2008, 1–6.*
- 28 Chakraverty, R. et al. *Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. Blood. 2002, 99(3): 1071-1078.*

- 29 Spyridonidis, A. et al. *Pharmacokinetics and clinical activity of very low-dose alemtuzumab in transplantation for acute leucemia*. Bone Marrow Transplantation. 2011, 46: 1363–1368.
- 30 Busemann, C. et al. *Low-dose alemtuzumab vs. standard policy for prevention of graft-versus-host disease in unrelated and related allogeneic stem cell transplantation—a matched pair analysis*. Ann Hematol, 2013, 92(7): 945–95.
- 31 Milano, F. et al. *Intensive strategy to prevent CMV disease in seropositive umbilical cord blood transplant recipients*. Blood. 2011, 118(20): 5689-5696.
- 32 Boeckh, M. et al. *Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges, and future strategies*. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2003, 9(9): 543-558.
- 33 Rosa, C. L. et al. *Primary response against cytomegalovirus during antiviral prophylaxis with valganciclovir, in solid organ transplant recipients*. Transpl Int. 2011, 24(9): 920–931.

Table 1. Patients, Diagnosis and Transplant Characteristics

Variable	No.	Percent %
Gender		
Male	34	59,6
Female	23	40,4
Recipient age		
Median	24	
Children (<18 years-old)	20	35
Adults	37	65
Disease		
ALL	13	23
AML	17	30
CML	6	10.5
MDS	5	9
Severe Aplastic Anemia	10	17.5
other	6	10
Disease		
Malignant	45	78.9
Nonmalignant	12	21.1
Recipient CMV status before transplantation		
Negative	6	10,5
Positive	51	89,5
Graft source		
Bone marrow	16	28,1
Peripheral blood	39	68.4
cord blood	2	3,5
Conditioning regimen		
Myeloblative (BuCy)	35	61,4
Reduced intensity	22	38,6
alemtuzumab (before conditioning regimen)		
Yes	23	40,4
No	34	59,6
GVHD prophylaxis		

	CsA	11	19,3
	CsA + MTX	44	77,2
	Other	2	3.6
Donor type			
	HLA-match Related	46	80,7
	Unrelated	11	19,3

CsA indicates cyclosporine; MTX, methotrexate; ALL, acute lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome.

Disease type: Other: Fanconi Anemia (2 cases); Lymphoma (1 case); Myelofibrosis (3 cases).

Table 2. aGVHD (grades 2-4) according to alemtuzumab use :

	aGVHD (n=11)		Absence aGVHD	
	No.	Percent %	No.	Percent %
alentuzumab	1	1.7	22	38.6
No alemtuzumab	10	17.5	24	42.2

Chi-square test $p=0.03$

aGVHD indicates acute graft-versus-host

Figure 1: AGVHD (Grade 2-4) cumulative incidence

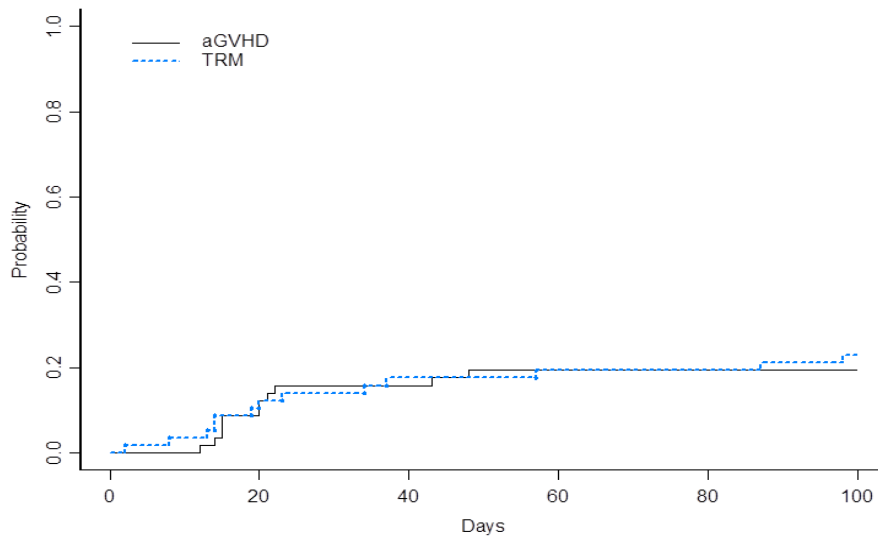


Figure 2: Cumulative incidences of AGVHD (grade 2-4) at D+100 for patients receiving or not alemtuzumab before alloHSCT

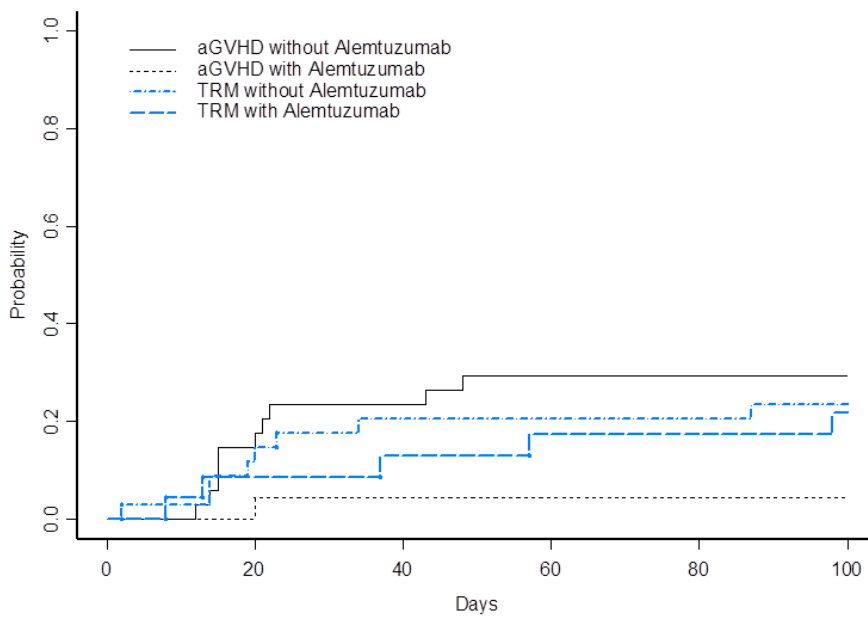


Figure 3: Cumulative incidence of antigenemia assay after transplant at D+100

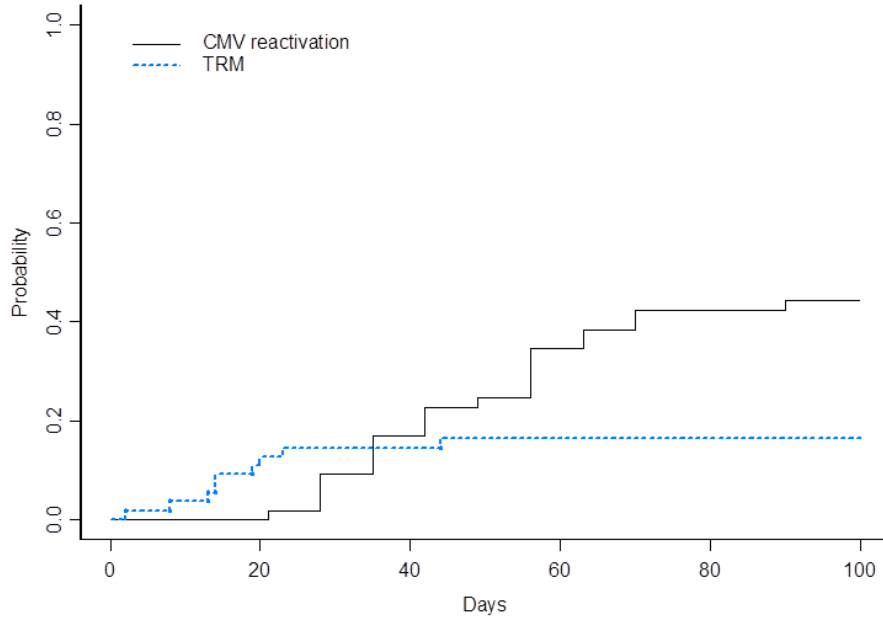


Figure 4: Cumulative incidence of CMV reactivation at D+100 for patients receiving or not alemtuzumab

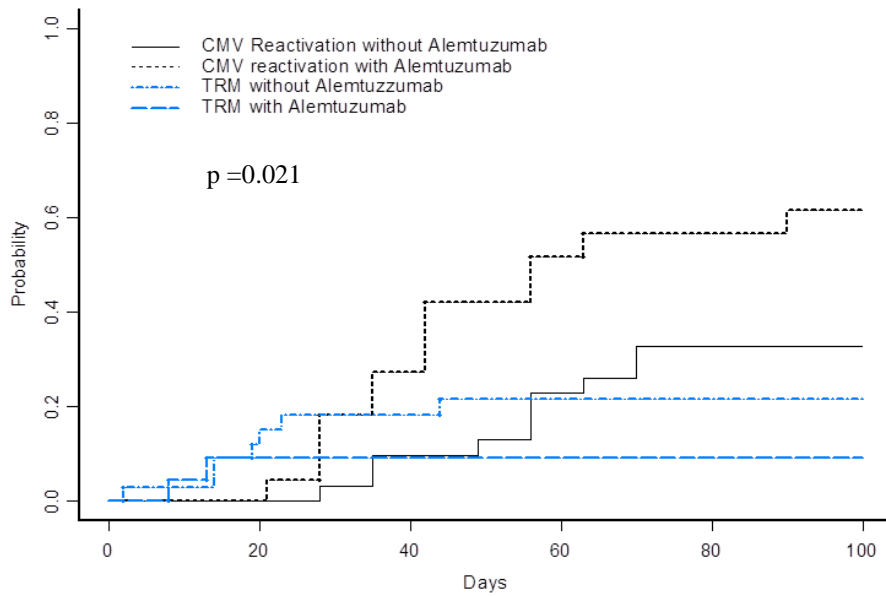


Figure 5: Overall Survival at one year

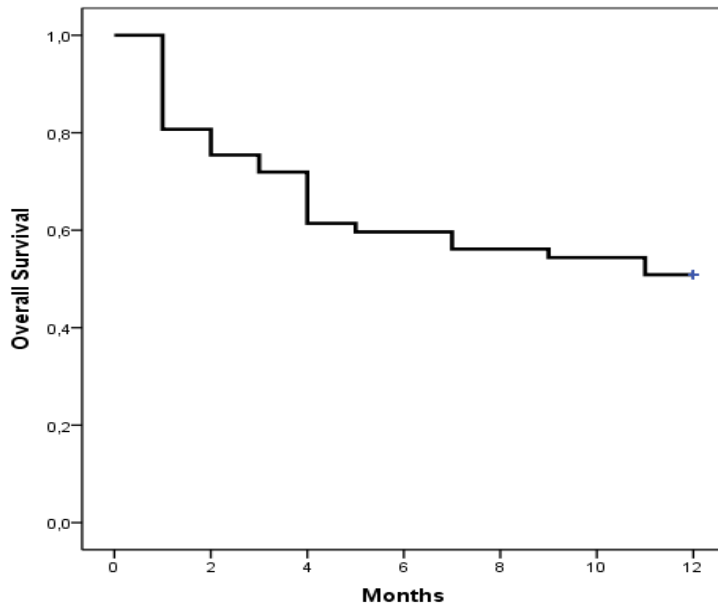
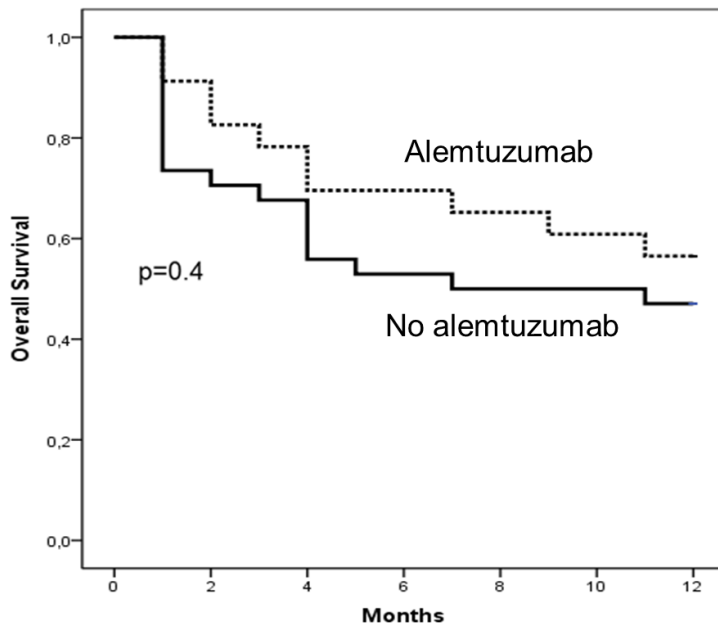


Figure 6: Overall survival at one year for patients receiving or not alemtuzumab



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do alemtuzumab no regime de condicionamento do TCTH alogênico mostrou-se eficaz no controle da instalação e desenvolvimento da DECH aguda grave (estágio 2-4). Nos pacientes que fizeram uso do alemtuzumab no regime de condicionamento ocorreu apenas 1(1.7%) diagnóstico de DECH aguda e 10(17.5%) casos foram diagnosticados nos pacientes que não receberam o alemtuzumab ($p=0.03$). A incidência cumulativa a DECH aguda nos primeiros cem dias após TCTH alogênico foi de 4.3% nos pacientes que receberam alemtuzumab e 29.4% nos pacientes sem alemtuzumab ($p=0.02$).

No entanto, o uso do alemtuzumab no regime de condicionamento aumentou significativamente o risco de desenvolvimento de reativação do CMV nos primeiros cem dias após TCTH alogênico. A incidência cumulativa da reativação de CMV em D+100 dias foi de 61.5% para pacientes que receberam alemtuzumab e de 32.6% para pacientes que não receberam o anticorpo no regime de condicionamento ($p=0.02$).

Nos primeiros cem dias após TCTH alogênico, houve dezesseis óbitos, deste total apenas 2(12.5%) óbitos foram reportados a DECH aguda e 9(56.5%) causados por sepse. Em um ano de acompanhamento pós TCTH, a sobrevida global foi de 50%. O uso do alemtuzumab não impactou na sobrevida, sendo que a sobrevida nos pacientes que receberam o alemtuzumab foi de 57% e nos pacientes sem alemtuzumab a sobrevida foi de 47% ($p=0.4$).

Assim, o uso do alemtuzumab no regime de condicionamento dos pacientes submetidos ao TCTH alogênico no HC- UFMG correspondeu aos dados da literatura científica de que o alemtuzumab previne a instalação e desenvolvimento da DECH aguda. Porém, o aumento significativo de reativação de CMV destaca para a necessidade de discussão sobre os critérios de uso do alemtuzumab nos protocolos de transplantes de países em desenvolvimento tendo em vista o perfil dos pacientes atendidos e método de controle de reativação de CMV.

A prevalência de CMV na população brasileira é alta e os recursos de controle de reativação de CMV ainda são limitados como, por exemplo, a falta de exame de PCR como rotina para detecção precoce de reativação do vírus. Além disso, a dose

empregada de alemtuzumab no regime de condicionamento tem sido foco de discussão e avaliação devido ao efeito de prolongamento do período de reconstituição imune.

Esse estudo destaca que o uso do alemtuzumab neste perfil de pacientes submetidos ao TCTH alogênico deve ser cauteloso. Estratégias efetivas de monitoramento e prevenção de reativação do CMV precisam ser discutidas e empregadas, principalmente, em pacientes que recebem o alemtuzumab antes do TCTH alogênico.

REFERÊNCIAS

- 1 Goker, H., Hanznedaroglu, I. C., & Chao, N. J.. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and magement. *Exp. Hematol.* 2001, 29(3): 259 – 277.
- 2 Pasquini, M.C. Wang, Z., Horowitz, M. M. & Galé, R. P. 2010 report from the Center for International Blood and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin. Transplants.* 2010, 87 – 105.
- 3 MacMillan, M. L . , DeFor, T. E. & Weisdorf, D. J.. *The best endpoint for acute GVHD treatment trials.* *Blood.* 2010 115 (26): 5412-5417.
- 4 Jagasia, M. et al. *Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation.* *Blood.* 2012, 119 (1): 296-307.
- 5 Schonberger, S. et al. *Prospective, comprehensive, and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* *Biol Blood Transplantation.* 2010, 16 (10): 1428-1435.
- 6 George, B. et al. *Pré-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus temains the most important deeterminant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillence and preemptive therapy..* *Transplant infectious disease.* 2010, 12 (4): 322-329.
- 7 Bayer HeathCare. *Alentuzumabe, Campah®.*
- 8 Jacobson, L.O. et al. *Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation.* *J Lab Clin Med.* 1949, 1538-43.
- 9 Appelbaum, R. F. et al. *Thomas` hematopoietic cell transplantation.* 4^a Ed. Willey blackwell.
- 10 Epstein, R.B. et al. *Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs.* *Transplantation.* 1968, 45-58.

- 11 Thomas, E. D. et al. História, bases científicas e legais do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Transplante de células-tronco hematopoiéticas. Ed Atheneu. Cap. 1. 2010.
- 12 Pereira, W. A. *Manual de transplantes de órgãos e tecidos*. 3ª edição, Guanabara, 2004.
- 13 Copelan, E. A. *Hematopoietic stem-cell transplantation*. The new england journal of medicine. 2006, 354: 1813-26.
- 14 Hamerschlag, N. *Manual de hematologia*. Sociedade beneficente israelita brasileira, 1ª ed., 2010.
- 15 Cavallero, S. R. A. & Pinheiro, E. D. *Indicações do TMO*. Transplante de Medula Ossea: Abordagem Multidisciplinar.
- 16 Schumacher, H. R. et al. *Acute Leukemia*. Clinics in laboratory medicine. 2002.
- 17 Kennedy, B. et al. *Camptothecin and fludarabine in combination are highly active in refractory chronic lymphocytic leukemia*. Blood. 2002, 99 (6):2245-2247.
- 18 Boeckh, M. & Geballe, A. P. *Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle*. J Clin Invest. 2011, 121(5):1673–1680.
- 19 Gandhi, S. et al. *Allogeneic stem cell transplantation using alemtuzumab-containing regimens in severe aplastic anemia*. Int J Hematol. 2013, 97 (5) 573–580.
- 20 Passweg J. R. & Aljurf M. *Treatment and hematopoietic SCT in aplastic anemia*. Bone Marrow Transplantation. 2013, 48: 161.

- 21 Marsh, J.C.W., et al. *Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia*. British Committee for Standards in Haematology (BCSH). British Journal Haematology. 2009, 147: 43–70.
- 22 Saboya, R. et al. *Regimes quimioterápicos de condicionamento para transplante de células-tronco hematopoiéticas*. Transplante de células tronco hematopoiéticas. Editora Atheneu, 2010.
- 23 Faria, S. L., Freeman, C. R. & Guizzardi, M. *Regimes de condicionamento com irradiação corporal total*. Transplante de células tronco hematopoiéticas. Editora Atheneu. 2010.
- 24 Vassilou, G. S. et al. *Improved outcome of alternative donor bone marrow transplantation in children with severe aplastic anaemia using a conditioning regimen containing low-dose total body irradiation, cyclophosphamide and Campath*. British Journal Haematology. 2001, 114: 701-705.
- 25 Champlin, R. et al. *Nonmyeloablative preparative regimens for allogeneic hematopoietic transplantation*. Bone Marrow Transplantation. 2001, S13–S22.
- 26 Horowitz, M. M., et al. *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. Blood. 1990, 75(3): 555-562.
- 27 Murphy, K. et al. *Imunobiologia de Janeway*. Ed Artmed, 7ª edição, 2010.
- 28 Gorkzynski, R & Stanley, J. *Imunologia Clínica*. Ed Reichmann & Affonso, 2001.
- 29 Abbas, A.K. et al. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed., 2007.
- 30 Azevedo, W. & Ribeiro, M. C.. *Fonte de células-tronco hematopoiéticas para transplantes*. Medicina, Ribeirão Preto, USP. 2000, 33: 381-389.
- 31 Broxmeyer, H. E. & Smith, F. O. *Cord blood hematopoietic cell transplantation*. Thomas' hematopoietic cell transplantation, Cap. 39, 4ª ed. Willey blackwell.

- 32 Hale, G. et al. *CAMPATH-1 antibodies in stem-cell transplantation*. *Cytherapy*. 2001, 3 (3): 145–164.
- 33 Confer, D. L., Miller, J. P. & Chell, J. W. *Bone Marrow Peripheral blood cell donos and donor registries*. Thomas` hematopoietic cell transplantation, Cap. 38, 4^a ed. Willey blackwell.
- 34 Champlin, R. E. et al. *Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation*. *Blood*. 2000, 95 (12): 3702-3709.
- 35 Vigorito, A. C. et al. *A randomised, prospective comparison of allogeneic bone mar-row and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies*. *Bone Marrow Transplantation*, 1998, 21 1145-1151.
- 36 Haldal, D. et al. *A randomised study of allogeneic transplantation with stem cells from blood or bone marrow*. *Bone Marrow Transplantation*. 2000, 25(11): 1129-1136.
- 37 PORTARIA Nº 2.381/GM Em 29 de setembro de 2004. Acesso em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-2381.htm>
- 38 Souza M. A., et al. *Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil*. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical*. 2010, 43 (4): 359–361.
- 39 Gluckman, E. et al. *Outcome of Cord-Blood Transplantation from Related and Unrelated Donors*. *The New England Journal Medicine*. 1997, 337: 373-381.
- 40 Thomsom, B. G. et al. *Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation*. *Blood*. 2000, 96 (8): 2703-2711.

- 41 Martin , P. L. *Results of the Cord blood transplantation (COBLT): outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with lysosomal and paroxisomal storage diseases.* Biology Blood Marrow Transplantation. 2006, 184-194.
- 42 Symons, H. J. & Fuchs, E. J. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donos. Bone Marrow Transplantation. 2008, 42: 365–377.
- 43 Gratwohl, et al. *Hematopoietic stem cell transplantation A Global Perspective.* The journal of the Medical association. 2010, 303 (16): 1617–1624.
- 44 Pereira, N. F. et al. *Seleção de doador de medula óssea ou sangue periférico.* Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia. 2010, 32 (supl. 19): 3-5.
- 45 Woolfrey, A. E. *Donor selection for hematopoietic cell transplantation.* Thomas` hematopoietic cell transplantation, Cap 48, 4ª ed. Willey blackwell.
- 46 Torres, M. et al. *Seleção de doador não aparentado.* Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia. 2010, 32 (supl. 1): 6-7.
- 47 Saboya, R. et al. *Transplante de medula óssea com doador familiar parcialmente compatível.* Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia. 2010, 32 (supl.1): 13-15.
- 48 Machado, L. N. *Papel do enfermeiro nas diferentes fases do TMO.* Transplante de Medula Ossea: Abordagem Multidisciplinar.
- 49 Bonam, P. R. F. et al. *Aspectos clínicos, biológicos, histopatológicos e tratamentos propostos para a mucosite oral induzida por radioterapia: revisão da literatura.* Revista Brasileira de Cancerologia. 2005, 51(30): 235-242.
- 50 Santos, R.V. et al. *Aplicação terapêutica dos anticorpos monoclonais.* Rev. Brasileira Aler. Imunop. 2006, 29(2): 77-85.

- 51 Voltareli, J.C. & Stracieri, A. P. L. *Aspectos imunológicos do transplante de células tronco hematopoiéticas*. Medicina, Ribeirão Preto. 2000, 33: 443-462.
- 52 Riechmann, L et al. *Reshaping human antibodies for therapy*. Nature, 1988, 332 (24): 323-327.
- 53 Enblad, G. et al. *A pilot study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) therapy for patients with relapsed or chemotherapy-refractory peripheral T-cell lymphomas*. Blood. 2004, 103 (8): 2920-2924.
- 54 Rowan, W. et al. *Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) mediates growth inhibition in human B- and T-lymphoma cell lines, and subsequent emergence of CD52-deficient cells*. Immunology. 1998, 95(3): 427-436.
- 55 Lundin, J. et al. *Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)*. Blood. 2002, 100 (30): 768-773.
- 56 Mould, D. R. et al. *Population pharmacokinetics-pharmacodynamics of alemtuzumab (Campath) in patients with chronic lymphocytic leukaemia and its link to treatment response*. British Journal of Clinical Pharmacology. 2007, 64 (3): 278-291.
- 57 Moreton, P. et al. *Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival*. Journal of Clinical Oncology. 2005, 23 (13): 2971-2990.
- 58 Keating, M. J. et al. *Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study*. Blood. 2002, 99 (10): 3554-3561.
- 59 Lozanski G. et al. *Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions*. Blood. 2004, 103 (9): 3278-328.
- 60 Isaacs, J. D. et al. *Campath-1H in rheumatoid arthritis an intravenous dose-ranging study*. Br J. Rheumatology. 1996, 35(3): 231-240.

- 61 Poire, X. & Besien, K. V. *Alemtuzumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. NIH Public Access. 2011, 1099–1111.
- 62 Choi, S. W., Levine, J. E. & Ferrara, J. L. M.. *Pathogenesis and management of graft-versus-host disease*. Immunology and allergy clinics of North America. 2010, 30 (10): 75-101.
- 63 Schweighofer, C. D. & Wendtner, C. M. *First-line treatment of chronic lymphocytic leukemia: role of alemtuzumab*. OncoTargets and Therapy. 2010, 3: 53-67.
- 64 Besien, K. et al. *Phase I-II Study of Clofarabine-Melphalan-Alemtuzumab Conditioning for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant . 2012, 913–921.
- 65 Morris E.C., et al. *Pharmacokinetics of alemtuzumab used for in vivo and in vitro T-cell depletion in allogeneic transplantations: relevance for early adoptive immunotherapy and infectious complications*. Blood. 2003, 102 (1): 404–6.
- 66 Siegal, D. et al. *Graft-versus-host disease following marrow transplantation for aplastic anemia diferente impacto of two GVHD prevention strategies*. Bone Marrow Transplantation. 2008, 1–6.
- 67 Pasquini, M. C. *Impacto of graft-versus-host disease on survival*. Best Practice & Research clinical Haematology. 2008, 21 (2): 193-204.
- 68 Johnston, L. *Acute graft-versus-host disease: differing risk with differing graft source and conditioning intensity*. Practice & Research clinical Haematology. 2008, 21 (2): 177-192.
- 69 Lee, S. J. et al. *High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation*. Blood. 2007, 110 (13): 4576-4583.

- 70 Gluckman, E. et al. *Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant guidelines for donor choice*. *Experimental Hematology*. 2004, 32 (4): 397–407.
- 71 Horan, J. T. et al. *Survival after HLA-identical allogeneic peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for hematologic malignancies: meta-analysis of randomized controlled trials*. *Bone Marrow Transplantation*. 2003, 32: 293–298.
- 72 Mielcarek, M. et al. *Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*. 2003, 102 (2): 756-762.
- 73 Sorrow, M. L. et al. *Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005, 11 (10): 814-815.
- 74 Palmer, J. et al. *Doença do Enxerto-contra-hospedeiro aguda*. *Transplante de células tronco hematopoiéticas*. Editora Atheneu. Cap 30, 2010.
- 75 Flomenberg, N. et al. *Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome*. *Blood*. 2004, 104 (7): 1923-1930.
- 76 Blazar, B. R. et al. *Advances in graft-versus-host disease biology and therapy*. *Nat Rev Immunol* . 2012, 12: 443–458.
- 77 Ferrara, J. L. M. & Anrin, J. H. *The pathophysiology of graft-versus-host disease*. *Thomas` hematopoietic cell transplantation*, Cap 16, 4^a ed. Willey blackwell.
- 78 Socie, G. & Blazar, B. R. *Acute graft-versus-host; disease the bench to the bedside*. *Blood*. 2009, 114(20): 4327-4336.

- 79 Vogelsang, G. B. et al. *Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant*. *Annu. Ver. Med.* 2003, 54: 29-52.
- 80 Filipovich, A. H. et al. *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report*. *Biology of blood and marrow transplantation*. 2005, 11: 945-956.
- 81 Cahn, J. Y. et al. *Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie cellulaire (SFGM-TC), Dana farber cancer institute (DFCI), and International bone marrow transplant registry (IBMTR) prospective study*. *Blood*. 2005, 106: 1495-1500.
- 82 Dignam, F. L. et al. *Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease*. *British Journal of Haematology*. 2012, 158 (1): 30-45.
- 83 Jaksch, M. & Mattson, J. *The pathophysiology of acute graft-versus-host disease*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2005, 61 (5): 398-409.
- 84 Wolf, D. et al. *Novel treatment concepts for graft-versus-host disease*. *Blood*. 2012, 119:16-25.
- 85 MacMillan, M. L., Todd, E. D & Weisdorf, D. J. *The best endpoint for acute GVHD treatment trials*. *Blood*. 2010, 115: 5412-5417.
- 86 Deeg, H. J. *How I treat refractory acute GVHD*. *Blood*. 2007, 109: 4119-4126.
- 87 Goodrum, F., Caviness, K & Zagallo, P. *Human Cytomegalovirus Persistence*. *Cell Microbiol* . 2012 May ; 14(5): 644–655.
- 88 Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. *Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells*. *N Engl J Med*. 1989, 320(26):1731–1735.

- 89 Walter EA, et al. *Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor.* N Engl J Med. 1995, 333(16):1038–1044.
- 90 Hebart, H. & Einsele, H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. Human Immunology. 2004, 65: 432-436.
- 91 Boeckh, M. and Ljungman, P. *How I treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients.* Blood. 2009, 113:5711-5719.
- 92 Boriskin, Y. S. et al. *Early detection of cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplant patients by reverse transcription-PCR for CMV spliced late gene UL21.5: a two site evaluation.* Journal of Clinical Virology. 2002, 24: 13–23.
- 93 Boeckh, M. et al. *Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges, and future strategies.* Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2003, 9: 543-558.
- 94 Chakrabarti, S. et al. *High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution.* Blood. 2002 99: 4357-4363.
- 95 Zaia, J. A. *Cytomegalovirus Infection.* Thomas` hematopoietic cell transplantation, Cap 16, 4^a ed. Willey blackwell.
- 96 Travi, G. & Pergam, S. A. Cytomegalovirus Pneumonia in Hematopoietic Stem Cell Recipients. Journal of Intensive Care Medicine. 2013, 1-13.
- 97 Mori. T. & Kato, J. *Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation.* Int Journal Hematology. 2010, 91:588–595.
- 98 Hirsch, H. H. et al. *An International Multicenter Performance Analysis of Cytomegalovirus Load Tests.* Clinical Infectious Diseases. 2013, 56(3):367–73.

ANEXOS

Anexo 1

REGISTRO DE EVOLUÇÃO – PACIENTES SUBMETIDOS TCTH RESP: _____

Data Entrada na Pesquisa: __/__/__ Data Saída: __/__/__ Reg: _____ Consentimento assinado: _____ sim/não

PACIENTE		EVOLUÇÃO
Nome: ¹ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	Data de Nascimento doador:	Primeira Recidiva após transplante
Data Nascimento: ² _ _ / _ _ / _ _	¹⁴ _ _ _ _ _ _ _ _	0) não 1) sim ²⁴ _ _
Sexo: ³ _ 1) M 2) F	Sexo: ¹⁵ _ 1) M 2) F	Data ²⁵ _ _ _ _ _ _ _ _
Grupo ABO: ⁴ _ 1) A 2) B 3) AB 4) O	CMV : ¹⁶ _	Se a morte relacionada ao transplante:
Fator Rh: ⁵ _ 1) negativo 2) positivo	1) Negativo 2) Positivo	DATA ²⁶ _ _ _ _ _ _ _ _
Diagnóstico: ⁶ _ 1) ALL 2) AML	Grupo ABO: ¹⁷ _	Causa da Morte
3) AL Secundária 4) Mielodisplasia	1) A 2) B 3) AB 4) O	_____
5) CML 6) CLL 7) NHL 8) D. Hodgkin	Fator Rh: ¹⁸ _	
9) Mieloma 10) Tumor Sólido 11) Anemia Aplásica	1) Negativo 2) Positivo	
12) Hemoglobinopatia		
13) Outros, _____		
Data do Diagnóstico: ⁷ _ _ _ _ _ _ _	TRANSPLANTE	GVHD Agudo
Data do Transplante: ⁸ _ _ _ _ _ _ _	Condicionamento (total dose/kg)	Profilaxia In vivo
Origem do Enxerto: ⁹ _ 1) Medula óssea	Quimioterapia _____	²⁷ _ _ _ _
2) Sang. Periférico 3) SCUP	¹⁹ _ _ _	0) não 1) CsA
Nº. Transplante Prévios: _____	1) Ciclofosfamida _____	2) Corticóide 4) Metotrexato
auto _ allo _	2) Melphalan _____	8) ALG/ATG _____
CMV pré TCTH ¹¹ _ 1) Negativo 2) Positivo	4) Ara-C _____	(mg/kg/dia)
	8) Thiotepa _____	16) Anticorpo monoclonal _____
	16) Bussulfan _____	(mg/kg/dia)
	Soroterapia: ²⁰ _	32) Outros _____
	0) não 1) ALG/ATG (mg/kg/dia)	
	2) Alemtuzumab _____	
1) Relacionado 2) Não Relacionado ¹² _	Peso na Data do Transplante (kg) ²¹ _ _ _ , _	ANTIGENEMIA PÓS TCTH DATA E RESULTADO
Compatibilidade HLA: ¹³ _	Infusão de Células/ kg	_____
1) Genótipo HLA idêntico;	Total de Cél. Nucleadas (10 ⁹ /kg)	_____
2) Gêmeo monozigótico;	²² _ _ _ , _ _ _	_____
3) Relacionado, fenótipo idêntico;	Total de Cél. CD34 (10 ⁶ /kg)	_____
4) Idêntico não relacionado;	²³ _ _ _ , _ _ _	_____
5) Não idêntico, relacionado;		
6) Não idêntico, não relacionado.		

Anexo 3

Anexo 4