

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Impacto Clínico da recuperação linfocitária precoce na reconstituição imunológica pós transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas

Lisandra Della Costa Rigoni

Porto Alegre

2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Impacto Clínico da recuperação linfocitária precoce na reconstituição imunológica pós transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas

Lisandra Della Costa Rigoni

Orientadora: Professora Maria Lúcia Scroferneker

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Della Costa Rigoni, Lisandra

Impacto da recuperação linfocitária precoce na reconstituição imunológica pós transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas / Lisandra Della Costa Rigoni. -- 2012.

91 f.

Orientadora: Maria Lúcia Scrofernecker.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Transplante de células tronco hematopoiéticas.
2. Recuperação linfocitária. 3. Reconstituição imunológica. I. Scrofernecker, Maria Lúcia, orient.
II. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Eduardo por ter me transmitido o seu amor pela pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por nos proporcionar o convívio com excelentes profissionais.

Aos colegas do Serviço de Hematologia, em especial, aos profissionais do Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas, pela garra, competência e excelência no atendimento de seus pacientes.

Aos meus queridos colegas e amigos Gustavo Fischer e Alessandra Paz por me ensinarem muito mais do que a teoria do transplante de células tronco.

A minha querida amiga Cristiane Weber por terem uma capacidade infinita de me tranquilizar nas horas difíceis com um bom humor impar.

A querida Neusa, que sempre está disposta a nos auxiliar com as burocracias da vida.

A Daniela Benzano, cujo auxílio com a parte estatística foi fundamental . Pude descobrir nela uma profissional extremamente competente e dedicada, sempre bem humorada e com capacidade de resolver problemas aparentemente sem solução.

A minha orientadora Professora Dra Maria Lúcia Scroferneker, pelo bom humor, competência, dedicação e disponibilidade infinita, que abriu mão de suas horas de lazer para me auxiliar.

A minha mãe Tânia e meu irmão Renan, pelo amor incondicional e disposição em auxiliar sempre.

Ao meu querido esposo Eduardo, pelo amor e paciência infinitos.

E por fim, aos pacientes do transplante de medula óssea que fazem com que acreditemos na nossa infinita capacidade de superar obstáculos e nos instigam a ir cada vez mais longe.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: O transplante de células tronco hematopoiéticas é capaz de curar as doenças hematológicas. O papel da repopulação linfocitária precoce no período pós transplan

te visa combater a células neoplásicas que resistiram ao regime de condicionamento e prevenir as infecções oportunistas graves. Sendo assim, uma contagem elevada de linfócitos no período pós transplante é capaz de reduzir a mortalidade relacionada ao transplante (TRM), melhorar a sobrevida livre de doença e reduzir a taxa de recidiva.

Objetivos: Avaliar a recuperação linfocitária precoce no D+21 e D+30 pós transplante correlacionado com a taxa de recidiva da doença de base, mortalidade, sobrevida global e livre de doença. Analisar a frequência das complicações infecciosas neste período.

Métodos: Analisado o número absoluto de linfócitos no D+21 e D+30 pós transplante de células tronco hematopoiéticas. Conforme dados da literatura definiu-se no D+21 e no D+30 aqueles com número absoluto de linfócitos abaixo e acima de 300 e se correlacionou os dados obtidos com a taxa de óbito, taxa de recidiva, sobrevida global em 5 anos, sobrevida livre de doença, em 5 anos, TRM em 100 dias. e mortalidade não relacionada a recaída (NRM).

Resultados: Neste estudo foram incluídos 100 pacientes portadores das seguintes neoplasias hematológicas: leucemia mielóide aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias secundárias e síndrome mielodisplásica. Destes,

55 pacientes eram do sexo masculino e 45 do sexo feminino. A média de idade foi de 27,9 anos (mínima 9 meses e máxima 55 anos). A mediana do tempo de seguimento foi de 601 dias (IC 95% 106-1845).

A mediana de CD 34 infundidos foi de 4,0 (IC 95% 2,4-5,7) e quanto a origem destas células CD 34 infundidas 85% foram de medula óssea (MO), 12% periférica (PBSC) e 3% sangue de cordão umbilical (SCU).

Quanto ao tipo de condicionamento realizado 22% foram não mieloablativos e 78% mieloablativos. A mediana de linfócitos no D+21 foi de 460 (IC 95% 0 - 6250) e no D+30 foi de 760 (IC 95% 40-6370).

Com relação a taxa de infecções observou-se que 19% das infecções foram de etiologia viral, 65 % bacteriana e 17% fúngicas.

A sobrevida global (OS) em 5 anos foi de 44 % , sobrevida livre de doença (DFS) foi de 37,7% , a mortalidade relacionada ao transplante (TRM) em 100 dias foi de 32,5%. E a mortalidade não relacionada a recidiva (NRM) em 5 anos foi de 40,2%.

No desfecho óbito observamos que 69% dos pacientes que foram a óbito no D+21 tinham linfócitos abaixo de 300, e 43,9% tinham linfócitos acima de 300 ($p < 0,05$).

Pacientes com valores menores que 300 no dia 30 tem 2,20 vezes o risco de irem a óbito quando comparados com aqueles com valores acima de 300 (IC 95% 1,03-4,69) ajustado para DECH e CD34. Pacientes com valores menores que 300 no dia 30 tem 3,76 vezes o risco de irem a óbito em menos de 100

dias quando comparados com aqueles com valores acima de 300 (IC 95% 1,23-11,46)

Conclusões: A reconstituição linfocitária precoce (> 300) no D+21 e no D+30 melhora a sobrevida global e livre de doença, bem como reduz a taxa de recidiva da doença de base e reduz a mortalidade.

Palavras chave: número absoluto de linfócitos, transplante de células tronco hematopoiéticas, recuperação linfocitária.

ABSTRACT

Background: The role of repopulating lymphocyte after allogenic stem cell transplantation (SCT) includes the prevention of serious infections and attacking residual tumor cells in the early post transplant phase. Therefore, the current study analysed the role of the absolute lymphocyte count (ALC) on day 21 and 30 after SCT in predicting transplant outcomes of patients in terms of the risk of transplant related mortality (TRM) recurrence of original disease and risk of opportunistic infections.

Objective: Evaluate early lymphocyte recovery on D +21 and D +30 post-transplant correlated with the rate of recurrence of the underlying disease, mortality, overall survival and disease free survival. Analyzed the frequency of infectious complications in this period.

Methods: Analyzed the absolute lymphocyte count in the D +21 and D +30 after hematopoietic stem cell transplantation. According to literature data set the we correlate the absolute lymphocyte count in the D +21D +30 below and above 300 these data with the rate of death, relapse rate, overall survival in 5 years, disease-free survival in 5 years , TRM in 100 days and mortality unrelated to relapse (NRM).

Results : Included in the study 100 patients with the following hematologic malignancies: acute myeloid leukemia, acute lymphocytic leukemia, secondary leukemia and myelodysplastic syndrome. Of these, 55 patients were male and 45 female. The average age was 27.9 years (minimum 9 months and maximum 55 years). The median follow-up was 601 days (95% CI 106-1845).

The CD 34 median that was infused was 4.0 (95% CI 2.4 to 5.7). The source of stem cells infused was 85% of bone marrow (BM), peripheral 12% (PBSC) and 3 % of umbilical cord blood (UCB).

Regarding the type of conditioning performed 22% were non myeloablative and 78% of lymphocytes were mieloablative. The median of absolute lymphocyte count in the D +21 was 460 (95% CI 0 to 6250) and D +30 was 760 (95% CI 40-6370).

Regarding the rate of infections were observed 19% viral infections , bacterial in 65% and fungal in 17%.

Overall survival (OS) at 5 years was 44%, disease-free survival (DFS) was 37.7%, transplant related mortality (TRM) in 100 days was 32.5%. Non relapsed mortality (NRM) at 5 years was 40.2%.

The death rate found that 69% of patients who died at the D +21 had presented lymphocytes count below 300, and 43.9% were above 300 lymphocytes ($p < 0.05$).

Patients with counts less than 300 in D+30 presented 2.20 times risk of death when compared with those who presented values above 300 (95% CI 1.03 to 4.69) adjusted for GVHD and CD34. Patients presenting values less than 300 in 30 days have 3.76 times more risk of death in less than 100 days compared with those with values above 300 (95% CI 1.23 to 11.46).

Conclusions: The early lymphocyte reconstitution (> 300) in D +21 D +30 improves overall survival and disease-free and reduces the relapse rate of the underlying disease and reduces mortality.

Keywords: absolute lymphocyte count, allogeneic stem cell transplantation, lymphocyte recovery.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Frequência de óbito, óbito em menos de 100 dias, Mortalidade relacionada ao transplante em 100 dias (TRM) e mortalidade não relacionada a recidiva (NRM).	75
Tabela 2. Descrição dos dados para o D+21	78
Tabela 3. Descrição dos dados para o D+30	79

Lista de Figuras

Figura 1 – Fases das infecções oportunistas entre os receptores de TCTH . 31

Figura 2 – Fisiopatologia do GVHD 34

Figura 3 – Gráfico de sobrevida global para o D+21 e D+30 de acordo com linfócitos < 300 e >300. 73

Figura 4 – Gráfico de sobrevida livre de doença para o D+21 e D+30 de acordo com linfócitos < 300 e >300..... 73

Figura 5 – Gráfico de mortalidade não relacionada a recaída para o D+21 e D+30 de acordo com linfócitos < 300 e >300. 74

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

APCs células apresentadoras de antígenos

DECH doença do enxerto contra-hospedeiro

DFS sobrevida livre de doença

DLI infusão de linfócitos do doador

G-CSF fator estimulador de crescimento de colônia de granulócitos

GVHD sigla em inglês, equivalente ao DECH

GVL efeito do enxerto contra o tumor

HLA Antígeno Leucocitário Humano

IFN- γ interferon gama

LMA leucemia mielóide aguda

LLA leucemia linfocítica aguda

MO medula óssea

NK células natural killer

NRM mortalidade não relacionada a recaída

OS sobrevida global

PBSC células tronco de origem periférica

SCU sangue de cordão umbilical

SMD síndrome mielodisplásica

TCTH transplante de células tronco hematopoiéticas

TNF- α fator de necrose tumoral alfa

TRM mortalidade relacionada ao transplante

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
REVISÃO DA LITERATURA	22
OBJETIVO PRINCIPAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO ESTUDO:.....	37
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	38
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	43
ABSTRACT	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
ANEXOS	67
METODOLOGIA.....	67
ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
FICHA DE COLETA DE DADOS.....	88

INTRODUÇÃO

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) pode ser definido, como a transferência das células tronco de um indivíduo a outro (transplante alogênico), ou o retorno de células previamente estimuladas de um mesmo indivíduo após a sua manipulação (transplante autólogo).

O objetivo do TCTH é proporcionar o desenvolvimento de um novo sistema imunológico no receptor a partir das células tronco infundidas do doador.

O transplante alogênico de medula óssea pode curar ou aumentar a sobrevida em uma grande variedade de doenças incluindo as leucemias, linfomas, doenças mieloproliferativas, mielodisplasias, síndromes que cursem com falência medular, imunodeficiências congênitas, deficiências enzimáticas e hemoglobinopatias. No entanto, em função da elevada morbi-mortalidade relacionada ao procedimento determinada pela toxicidade dos regimes de condicionamento empregados, infecções e doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), a indicação do transplante deve ser individualizada. Para isto, torna-se necessário avaliar cuidadosamente alguns critérios com impacto sobre os resultados: idade do paciente, *status* da doença, comorbidades, tratamentos prévios, fonte das células tronco, tipo de condicionamento e a histocompatibilidade.

Nos últimos anos, progressos significativos têm sido realizados nesta área, aumentando o sucesso com este tipo de procedimento. Entre eles, observamos uma melhora nos cuidados intensivos, evolução de antimicrobianos e antifúngicos, maior especificidade dos quimioterápicos, doses menores de irradiação, menor toxicidade dos condicionamentos, melhor compreensão da fisiopatologia das doenças e do funcionamento do sistema imunológico, avanços nas técnicas de exames de histocompatibilidade (possibilitando o uso de doadores não aparentados com fonte de células tronco), fontes alternativas de células tronco (cordão), surgimento de potentes imunossupressores, avanços nos exames diagnósticos (resultando na detecção precoce de infecções) e por fim, o conhecimento do efeito do enxerto contra o tumor (GVL).

Durante as últimas cinco décadas, vários estudos conseguiram demonstrar que a efetividade do TCTH alogênico na erradicação da neoplasia estava intimamente relacionada a atividade imunorreativa das células do enxerto, mais notavelmente, dos linfócitos (células T e NK principalmente). A idéia inicial do efeito GVL, surgiu da observação do aumento nas taxas de recaídas de leucemia naqueles pacientes que eram submetidos à TCTH singênico (de gêmeos idênticos) quando comparados aos demais. Logo após, descreveu-se que pacientes que recebiam células tronco depletadas em células T recaíam em uma frequência superior aos que não infundiam células depletadas.

A concretização deste efeito veio através da demonstração da indução de remissão após a infusão de linfócitos do doador (DLI) naqueles receptores que

apresentavam recaída da doença de base após o TCTH (observado primeiramente em um portador de leucemia mielóide crônica e posteriormente validado para as demais leucemias , linfomas e alguns tumores sólidos).

Após a realização do condicionamento (protocolo de quimioterapia baseado na doença de base de cada paciente, que tem por objetivo a destruição do tecido hematopoiético do receptor), o paciente receberá a infusão das células tronco de seu doador, este dia é conhecido como o D0 para fins didáticos. A partir de então, os demais dias, registrados com o sinal de + (ex: D+1, o primeiro dia após a infusão, e assim por diante). A seguir os receptores do TCTH passam por um período de pancitopenia severa que pode durar de semanas a meses; período este, onde estarão sujeitos a apresentar os mais variados quadros infecciosos, que muitas vezes ameaçam a vida do paciente e comprometem o sucesso do procedimento.

A rapidez da recuperação hematopoiética, varia de acordo com a fonte do enxerto: duas semanas para células tronco obtidas após a estimulação com fator de crescimento de granulócitos (G-CSF) , três semanas se a fonte for a medula, e a partir de quatro semanas se a fonte for o sangue de cordão umbilical. O dia em que se considera a pega do transplante é definido como o primeiro de três dias consecutivos na qual a contagem de neutrófilos, em número absoluto, é superior a 500// μ L.

A recuperação das contagens leucocitárias (neutrófilos, monócitos e células NK) é seguida pela recuperação plaquetária e do setor eritróide, sendo finalmente, seguida da recuperação de linfócitos T e B.

A reconstituição imunológica pós TCTH alogênico deve ser vista como um todo, no entanto; a recuperação linfocitária em particular, é a mais prejudicada após a realização do transplante. Inicialmente, a recuperação dos linfócitos se dá através das células NK (nos primeiros 3 meses), seguida pela recuperação de linfócitos T (em média 12 meses nos pacientes que não desenvolvem DECH, sendo este tempo maior nos pacientes que a desenvolvem).

Conceitualmente, pesquisas recentes sugerem que a demora na recuperação das contagens linfocitárias, é traduzida em um menor número de células NK e de células T, durante o período precoce pós TCTH, privando o paciente do efeito GVL; o que por sua vez, aumenta o risco de recaída da doença de base. A recuperação linfocitária precoce, por sua vez; sinaliza uma reconstituição imunológica rápida, levando a uma diminuição dos quadros infecciosos, reduzindo assim, a mortalidade. No entanto, tais estudos, são escassos e com um número muito reduzido de pacientes, de maneira que são necessários estudos maiores para a validação destes efeitos.

REVISÃO DA LITERATURA

Histórico:

O primeiro transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (TCTH) bem sucedido foi realizado em 1968. Desde então, mais de 800.000 pacientes receberam infusões de células tronco com o objetivo de salvá-las de doenças hematológicas benignas ou malignas ameaçadoras a vida.

Atualmente, estima-se que são realizados 55 - 60.000 transplantes de células tronco hematopoiéticas ao ano no mundo. As razões para um uso tão amplo incluem a eficácia comprovada e já bem estabelecida em inúmeras doenças, o conhecimento do melhor momento para realizar o procedimento de acordo com a patologia e as condições clínicas de cada paciente, maior número de doadores disponíveis, melhoria nas estratégias de condicionamento, imunossupressão e tratamento das infecções oportunistas, bem como de um suporte intensivo e hemoterápico mais adequados as necessidades de cada paciente. Tudo isso contribuiu para reduzir a morbimortalidade relacionada ao procedimento, ao mesmo tempo em que possibilitou o uso em pacientes com idade cada vez mais avançadas, pacientes com comorbidades e com maior comprometimento pela doença de base.

Definição:

O TCTH, resumidamente, pode ser definido como a substituição de células troncos hematopoiéticas por células tronco saudáveis capazes de reconstituir a hematopoiese normal daquele indivíduo. De acordo com a origem das células tronco ele poderá ser classificado em:

- **Autólogo:** células tronco são provenientes do próprio paciente através da aspiração direta da medula óssea ou por coleta de sangue periférico por método de aférese após estimulação com fatores estimuladores de colônia.
- **Alogênico:** células tronco são provenientes de doador externo (aparentado ou não) através da aspiração direta da medula óssea, por coleta de sangue periférico por método de aférese após estimulação com fatores estimuladores de colônia ou ainda, através do sangue de cordão umbilical.
- **Singênico:** células tronco são provenientes de doador gemelar idêntico através da aspiração direta da medula óssea ou por coleta de sangue periférico através do método de aférese após estimulação com fatores crescimento de colônia.^{3,4, 12,24}

O TCTH é eficaz em inúmeras patologias, em algumas ele corrige o defeito congênito ou adquirido nas células hematopoiéticas ou com função imunológica. Em outros casos, ele restabelece a hematopoiese após quimioterapias citotóxicas mieloablativas ou proporciona um tratamento imunológico potente contra as neoplasias.²⁴

O transplante de células tronco é constituído das seguintes etapas em ordem de execução:

- **Condicionamento:** tem a finalidade de criar espaço no estroma da medula óssea para que as novas células tronco, que serão infundidas na próxima etapa, consigam obter o espaço necessário e encontrem um microambiente adequado para a sua proliferação e diferenciação. Ainda tem função imunossupressora, de intensidade variável, de acordo com objetivo do condicionamento (mieloablação ou não). Por fim, o objetivo principal é o de ser capaz de erradicar a doença, proporcionando remissão a longo prazo. ⁴

- **Infusão:** consiste em transfundir no receptor as células tronco hematopoiéticas do doador. ⁴

- **Reconstituição imunológica:** visa restabelecer a hematopoiese normal no receptor. É a fase mais estudada na atualidade, pois nela veremos o sistema imunológico controlando o tumor, conhecido por efeito GVL (*graft versus leukemia*, ou traduzindo, o efeito do enxerto contra tumor).

Tem início com a repopulação dos linfócitos que tem papel fundamental na imunidade humoral e celular, auxiliando na proteção contra as infecções oportunistas graves e no combate a células tumorais residuais Também são estes linfócitos que poderão desencadear a doença do enxerto contra-hospedeiro (DECH).

Após a mieloablação do condicionamento, os pacientes iniciam um período de pancitopenia profunda que poderá durar poucas semanas até mais de um mês dependendo da fonte de célula tronco.

A rapidez da recuperação de neutrófilos dependerá do tipo do enxerto: duas semanas, para células tronco originadas de sangue periférico, três semanas, para as provenientes da medula óssea e quatro semanas nas originadas do sangue de cordão umbilical. A recuperação dos neutrófilos é acompanhada da recuperação de monócitos e células natural killer (NK), sendo que na sequência teremos a recuperação de plaquetas e hemácias e finalmente a recuperação de linfócitos T e B. ²⁴

Simultaneamente, ocorre o dano as superfícies das mucosas provocado pelo regime de condicionamento, proporcionando a disseminação hematogênica de patógenos comensais que habitam o trato gastrointestinal. Como resultado disso, teremos as complicações imediatas no período pós transplante, que geralmente se manifestam como neutropenia febril e mucosite cujo risco e gravidade das mesmas dependerão diretamente do grau de lesão inflingida as mucosas.

Os pacientes que foram submetidos aos condicionamentos não mieloablativo, exibirão uma pancitopenia heterogênea, cuja gravidade e duração irá se correlacionar diretamente com as drogas empregadas. Nos regimes com mínima mielossupressão e mínimo dano as mucosas, o risco de infecção no período imediato pós transplante é reduzido.

Embora o grau de mielossupressão seja menor após os regimes não mieloablativos, a extensão e o grau de linfodepleção são similares, com prolongados períodos de incompetência imunológica observados em ambos os condicionamentos. Isso ocorre porque o enxerto necessita de uma imunossupressão severa no receptor para que não aconteça a rejeição. Isso é válido mesmo nos casos em que enxerto e receptor são idênticos do ponto de vista de HLA (Antígeno Leucocitário Humano).

Reconstituição imunológica pós transplante:

Diferentemente da recuperação das demais linhagens hematopoiéticas, a recuperação linfocitária é um processo lento e prolongado. O restabelecimento da competência imunológica requer no mínimo alguns meses, mas em alguns pacientes, ela poderá levar muito anos. Em geral, as células *natural killers* (NK) são as primeiras a iniciarem a recuperação linfocitária, seguidas pelos linfócitos T CD8+, que atingirão níveis normais em cerca de dois a oito meses pós transplante. A seguir, teremos a recuperação dos linfócitos B e por fim, a recuperação dos linfócitos T CD4+. A extensão e o ritmo da recuperação linfocitária é dependente de inúmeros fatores, que dependerão do grau, extensão e duração da incompetência imunológica vivenciada pelo receptor.^{24,32}

A regeneração dos linfócitos em humanos é um processo ineficiente, que envolve duas vias distintas. Na primeira via, os linfócitos se regeneram da medula óssea através dos progenitores linfóides, resumindo a sua ontogenia e regenerando um sistema imunológico virgem, semelhante ao encontrado em

um recém nascido. A recuperação das células NK usa exclusivamente esta via, chegando a levar até dois meses para ocorrer de forma completa após o transplante. As células B também são primariamente regeneradas dos progenitores linfóides e darão início a sua repopulação na forma de linfócitos B primitivos. Entretanto, ao contrário da recuperação das células NK, a recuperação dos linfócitos B é altamente dependente de um microambiente medular especializado, que por sua vez, é suscetível aos danos do regime preparatório (condicionamento), e extremamente sensível aos efeitos tóxicos do GVHD e de seu tratamento. Sabe-se que até mesmo os pacientes que experimentam um episódio limitado de GVHD responsivo ao uso de corticóide, irão apresentar uma reconstituição significativamente reduzida dos seus linfócitos B quando forem comparados aos pacientes que não passaram pelo GVHD.

A recuperação total da competência humoral imune após o TCTH requer não somente a reconstituição dos linfócitos B virgens, mas principalmente, as células B de memória. Isso ocorre mais tardiamente como resultado da exposição ambiental e da vacinação. Sendo assim, mesmo aqueles pacientes que não experimentaram o GVHD e cuja recuperação linfocitária total de células B ocorreu em aproximadamente seis meses pós o TCTH, não deverão ser considerados como tendo readquirido a imunocompetência humoral total já neste período. Por pelo menos um ano após o transplante, todos os pacientes submetidos ao procedimento, permanecerão predispostos as infecções por bactérias encapsuladas e vírus. Os níveis séricos de imunoglobulina G, não permitem uma compreensão adequada da recuperação das células B, uma vez

que podem persistir após o regime de condicionamento (resistindo até mesmo a radiação), e pela sua longa meia vida poderão estar presente no soro em níveis séricos adequados, sem no entanto, refletir em uma resposta humoral contra patógenos específicos. A única maneira adequada de avaliar a recuperação da competência humoral após o transplante é através da identificação do aumento significativo de anticorpos específicos após a vacinação ou infecção. ^{24,32}

A regeneração das células T é guiada predominantemente pela via independente do timo, denominada de expansão homeostática periférica. Nesse processo, os linfócitos T maduros contidos no enxerto, se expandem significativamente em resposta a linfopenia das células T do receptor. Este processo é coordenado pela combinação de inúmeros fatores, entre os quais o aumento da disponibilidade de citocinas homeostáticas, como por exemplo, a IL-7 e IL-15, que vão se acumulando durante a linfopenia. As citocinas inflamatórias decorrentes da lesão tecidual produzida pelo regime de condicionamento, são responsáveis pela exposição de antígenos virais durante o período de linfopenia profunda.

A expansão homeostática periférica é muito mais eficiente para as linfócitos T CD8 do que para os linfócitos T CD 4, o que resulta na inversão da relação CD4/CD8 nos primeiros meses pós transplante. As células T de memória são as primeiras a expandirem após o transplante e podem ter origem no doador, nos casos em que não é feita a depleção de células T prévias a infusão, ou ter origem do próprio receptor no caso dos linfócitos que sobreviveram ao regime de condicionamento, aonde não é feita depleção

prévia destes linfócitos T. De todos os fatores analisados, a contagem de CD 4 pós transplante é o melhor preditor da recuperação da competência imunológica. Embora o valor preditivo das baixas contagens de linfócitos T CD4 não tenham sido tão extensivamente estudados nos receptores de TCTH como nos portadores de infecção pelo HIV, vários estudos mostram que a recuperação dessas contagens está associada a uma redução no risco de infecção e melhora na sobrevida pós transplante. Quando a regeneração das células T ocorrem através da via dependente do timo, há um substancial aumento no número de células CD 4 positivas com recuperação das células virgens CD 4 e CD8 positivas além de uma diversificação do repertório das células T. No entanto, como o microambiente do timo é altamente suscetível aos danos relacionados a idade, tipo de tratamento e presença ou não de GVHD, muitos receptores adultos mostram pouco ou nenhuma regeneração T timo dependente meses ou anos pós transplante.³²

Sabemos que como regra geral, todo indivíduo submetido ao transplante de células tronco hematopoiéticas passará por um período de imunossupressão severa em algum momento; no entanto, o grau desta imunossupressão irá variar de acordo com vários fatores.

O primeiro e mais importante é o GVHD, pois a sua presença causará um impacto negativo sobre todo o processo. Vários estudos demonstraram que a gravidade do GVHD se correlaciona com o grau de imunossupressão e a incidência de complicações infecciosas.

Em segundo lugar estão a idade do receptor, presença de comorbidades e exposição a agentes infecciosos no período pré transplante.

A seguir, em terceiro lugar, estão os fatores relacionados propriamente ao enxerto. Trabalhos recentes demonstram que os receptores de células tronco de origem periférica (PBSC) apresentam uma reconstituição imunológica precoce, medida pela recuperação linfocitária, quando comparados aos receptores de células tronco de cordão umbilical e transplante de enxertos haploidênticos que passam por depleção de células T; que resultam em uma reconstituição imunológica pobre, com elevadas taxas de complicações infecciosas.

A quantidade de células CD 34 infundidas também tem um papel importante, sugerindo que receptores de valores maiores ou equivalentes a 3×10^6 CD 34/Kg tem uma recuperação hematopoiética mais rápida, redução na incidência de infecções fúngicas e melhora na sobrevida global nos receptores de transplantes HLA idênticos.

Com relação a complicações infecciosas, há modelos que distinguem as infecções de acordo com a fase do transplante em que o paciente se encontra:

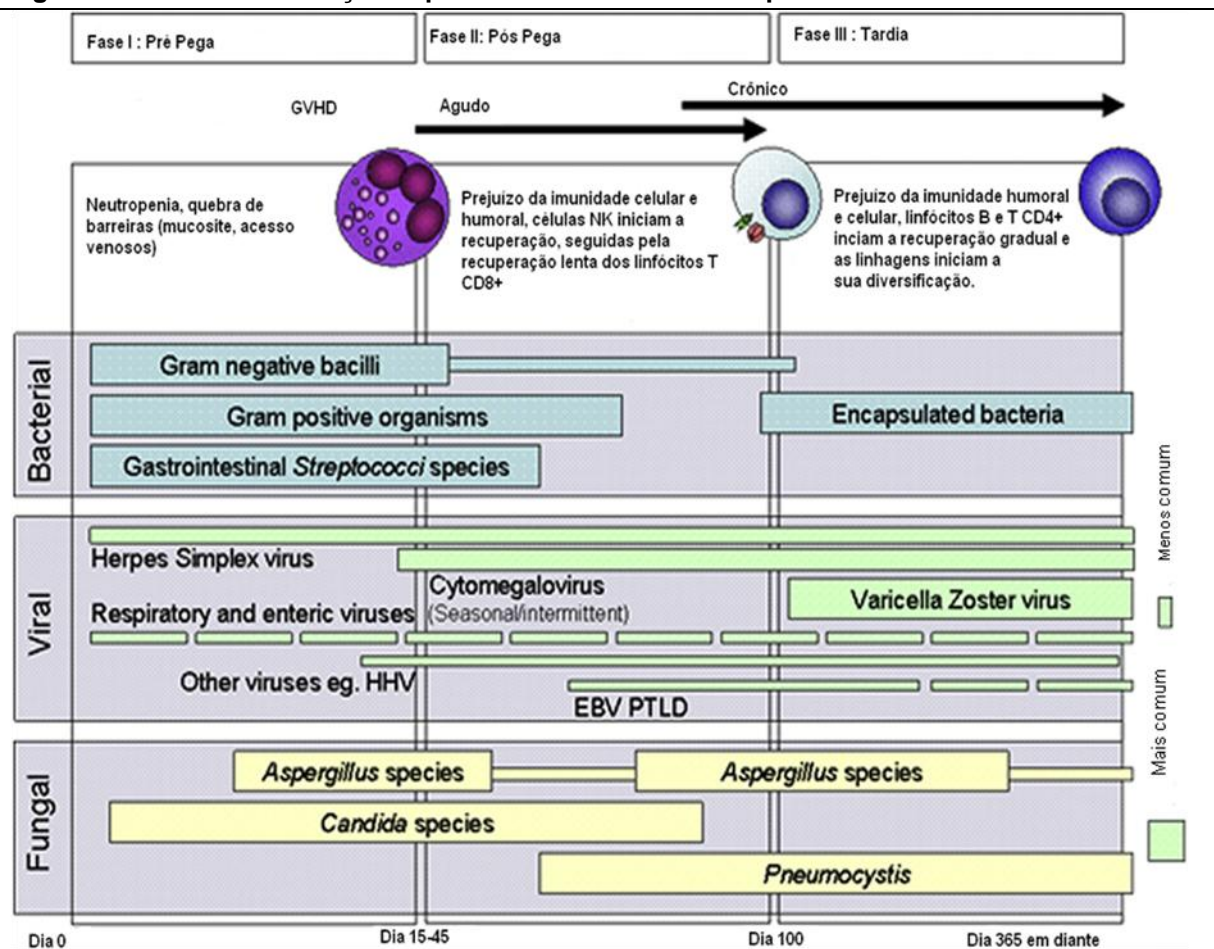
I) Fase de pré-pega (15-45 dias pós infusão): a neutropenia prolongada que acompanha esta fase associada a quebra das barreiras mucosas resultam em risco elevado para bacteremia e infecções fúngicas envolvendo as espécies de *Candida* e *Aspergillus*.^{3,4,13,24,30}

II) Fase pós pega (30-100 dias pós infusão): infecções relacionadas ao prejuízo da imunidade celular. O impacto e a gravidade das infecções desta fase estão

na dependência direta da extensão do GVHD e do tratamento imunossupressor empregado. Infecções mais comuns são as virais, em especial pela família *Herpesvirus*, mais comumente pelo citomegalovírus. Também podem ocorrer infecções por *Pneumocystis jiroveci* e pelas espécies de *Aspergillus*.

III) Fase tardia (pós 100 dias da infusão): infecções desta fase acometem principalmente os portadores de GVHD crônico e pacientes submetidos a transplantes com doador não relacionado. Patógenos comuns desta fase: citomegalovírus, varicela zoster e infecções por bactérias encapsuladas (por exemplo *Streptococcus pneumoniae*).

Figura 1 – Fases das infecções oportunistas entre os receptores de TCTH



Fonte: Adaptado de C Makall et al. (2009)

Doença do Enxerto Contra - Hospedeiro e efeito do Enxerto Contra o

Tumor

O sistema imunológico é capaz de controlar o câncer. Isso foi demonstrado pela primeira vez em modelos animais em 1956 por *Barnes et. al*²⁷ que relataram a erradicação de uma leucemia em modelos de ratos que foram irradiados e submetidos a infusão de células tronco alogênicas .

Nos modelos animais experimentais, o efeito GVL era visto tanto na presença quanto na ausência de GVHD.

A grande questão a que os estudos atuais visam responder é como manter a longo prazo, o efeito do enxerto contra o tumor e quais são os fatores que influenciam neste processo.

Para que se possa entender o GVL, é necessário inicialmente compreender a fisiopatologia de GVHD.

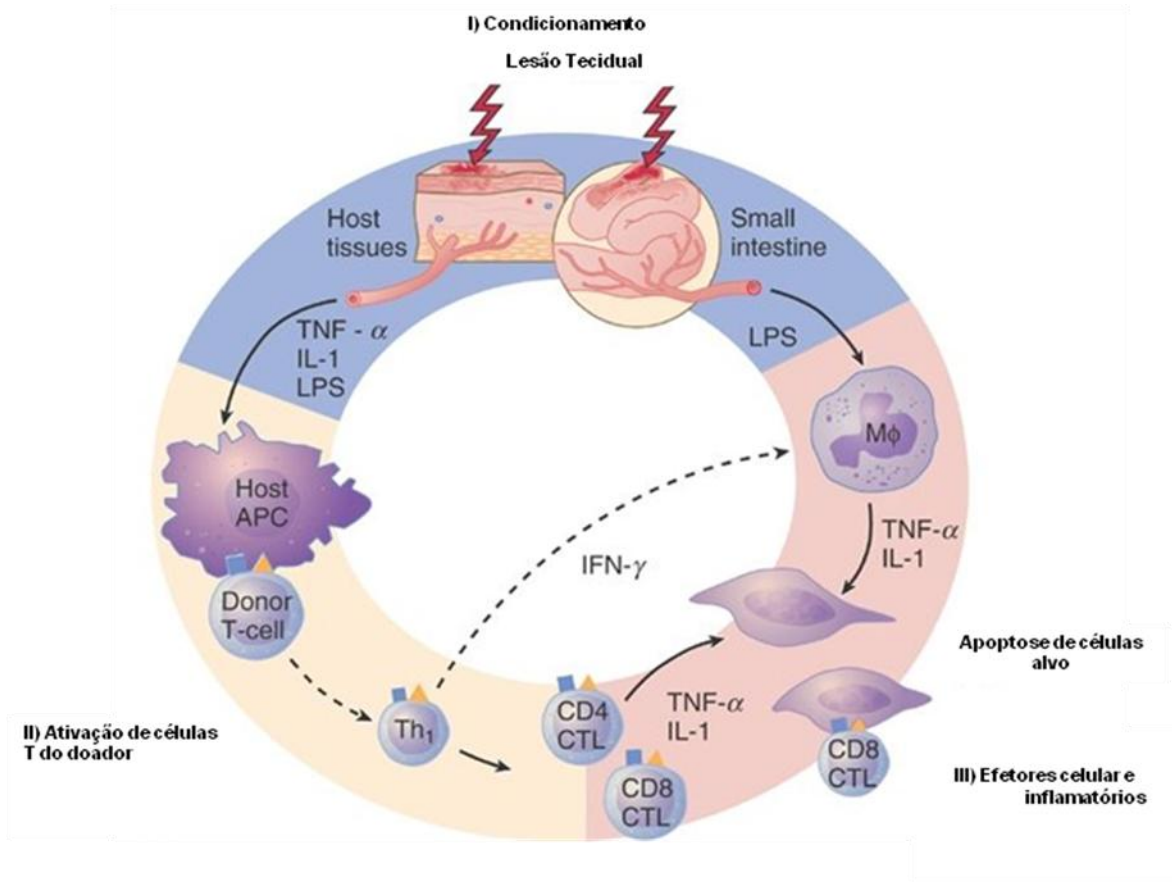
O GVHD ocorre quando as células T do doador reconhecem proteínas do complexo maior de histocompatibilidade do receptor que são apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), esse processo se baseia na existência de três etapas:

- I) **Lesão ao microambiente do hospedeiro** : inicia quando o regime de condicionamento (quimioterapia e/ou radioterapia) gera lesão tecidual com a ruptura das barreiras mucosas , o que resultará na liberação de inúmeras citocinas próinflamatórias: interleucina 1 (IL-1) e o fator de

necrose tumoral (TNF). Estas citocinas são as responsáveis por ativar as células apresentadoras de antígenos. A lesão tecidual da mucosa intestinal nesta fase proporciona a liberação de lipopolissacarídeos (LPS) que atravessam o tecido lesado e ativam a resposta imune inata que por sua vez, irá promover uma cascata de citocinas inflamatórias.

- II) **Ativação das células T:** a ativação das células apresentadoras de antígenos na fase anterior segue com um aumento na exposição dos antígenos, o que por sua vez, leva a ativação das células T que interagem com as APCs expressando interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que são os responsáveis pela expansão das células T. As células T nesta fase podem ser divididas em T *helper* 1 (Th1) que secretam IL-2 e IFN- γ , e T *helper* 2 (Th2) que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13.
- III) **Fase efetora celular e inflamatória:** a diferenciação e ativação das células T que iniciou na fase anterior, prosseguirá com o dano aos órgãos alvo (intestino, fígado e pele) induzidos pelos linfócitos T através de suas citocinas inflamatórias. A lesão tecidual por sua vez, amplifica os sinais inflamatórios, contribuindo e perpetuando a tempestade de citocinas que é o combustível do GVHD.

Figura 2 – Fisiopatologia do GVHD



Fonte: Adaptado de Ferrara (1999)

As células T do doador são estimuladas pelas células dendríticas do hospedeiro através da exposição a inúmeros antígenos do complexo menor de histocompatibilidade (mHA). As células T helper (CD4+) são estimuladas pelas células dendríticas através dos peptídeos do HLA de classe II. A estimulação das células T requer ainda, alguns sinais adicionais vindos de moléculas coestimuladoras (CD 40 ligante e CD 28), moléculas de adesão (ICAM e LFA3) e citocinas estimuladoras (IL-6, fator de necrose tumoral produzidas pelas

células apresentadoras de antígenos, interferon gama e o fator estimulador de colônia de granulócitos liberados pelas próprias células T).

A ativação das células dendríticas não estimula apenas os linfócitos T helper (CD4+), mas também os linfócitos T CD8+ (citotóxicos) através da apresentação de alguns peptídeos restritos da molécula de HLA de classe I. Tal ativação fornece uma "licença para matar" aos linfócitos T, e esta reação por sua vez, é a responsável pelo efeito GVL.^{3,4,32}

O mecanismo exato do efeito GVL não é completamente compreendido, porém acredita-se que o GVHD é fortemente associado ao efeito GVL, o que sugere que, em parte, alguns mecanismos sejam semelhantes.

Como já foi explicado anteriormente, o GVHD aparece no momento em que as células T do doador reagem e são ativadas por antígenos com diferentes padrões de expressão entre receptor e doador. Isso significa que as células T reconhecem os antígenos de formas diferentes dependendo se o enxerto recebido é completamente compatível ou não. No caso de transplante com presença de mismatch de HLA, as células T alorreativas tem como alvo os epítomos do HLA ou os peptídeos do complexo do HLA, enquanto que nos transplantes sem a presença de mismatch o alvo serão as moléculas do complexo menor de histocompatibilidade. A ação das células T durante o efeito GVL se dá por diferentes mecanismos, que incluem as vias mediadas por citocinas ou através da atividade citolítica direta.

O mecanismo efetor tardio, desencadeado pelo linfócito T CD4+, elimina as células tumorais via *Fas ligante*, enquanto que a reatividade T CD8+ é

predominantemente dependente da degranulação da perforina. Embora ambas as células T (CD4+ e CD8 +) produzam citocinas que estão envolvidas no processo de erradicação tumoral, as células T CD4+, provavelmente contribuam em maior escala . As citocinas originadas das células T como a IL-2, IFN- γ , TNF- α , podem recrutar outras células efetoras e potencializar a ação citolítica inicial.

A resposta ao efeito GVL é desprovida de especificidade o que pode levar a danos aos tecidos normais e assim, aumentar a morbi-mortalidade.²⁷

Sendo assim, a reconstituição de células B e T é fundamental no sucesso da imunoterapia pós transplante,sendo que a máxima resposta anti-tumoral será obtida através de uma rápida e funcional reconstituição linfocitária.

A rápida recuperação da contagem linfocitária após o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas parece refletir em uma baixa mortalidade relacionada ao transplante, bem como ser capaz de comprometer o desfecho do transplante em termos de taxas de recidiva.

Estudos prévios sugerem que a recuperação linfocitária precoce pós TCTH alogênico é um indicador que define grupos de alto risco para infecções oportunistas graves, mortalidade ou recidiva da doença pós transplante.

As infecções oportunistas na fase precoce pós TCTH, influenciam diretamente na mortalidade relacionada ao transplante, pois sinalizam uma

reconstituição imunológica lentificada, o que torna o paciente mais vulnerável as complicações.

OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a reconstituição linfocitária precoce no período pós TCTH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO ESTUDO:

- A) Avaliar os hemogramas seriados realizados durante a internação dos pacientes e definir a contagem linfocitária no D+21 e D+30;
- B) Relacionar a contagem linfocitária com a taxa de recaída da doença de base;
- C) Relacionar a contagem linfocitária com a taxa de mortalidade;
- D) Avaliar a frequência de quadros infecciosos neste grupo de pacientes.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. ABBAS A.; LICHTMANN A.; PILLAI S.; *Imunologia Celular e Molecular*, Saunders Elsevier, 6a Edição, Parte V, Capítulos 16 e 17, p.375-417; 2008.
2. AFZAL S et al.; Early lymphocyte recovery after allogeneic hematopoietic SCT is associated with significant GVL effect in pediatric ALL but not acute myelogenous leukemia –update study; *Bone Marrow Transplantation*, V44; p. 799-804; 2009.
3. APPELBAUM et al.; *Thomas Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, Blackwell, 4rd Ed Chapters 86 e 87; pages 1287-1324; 2009.
4. APPERLEY J ET al.; *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, ESH, 5 edição, Capítulos 6,9,10 e 11, p.128-145 e 180-235; 2008.
5. AULETTA JJ. et al; Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target; *Bone Marrow Transplantation*, V 35; p.835-857, 2005.
6. BÜLMANN L et al; Lymphocyte subset recovery and outcome after T cell replete allogeneic hematopoietic SCT; V46; p.1357-1362; 2011.
7. BURKE MJ et al.; Early lymphocyte recovery and outcomes after umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies; *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, V17; p.831-840; 2011.

8. CHAKRABARTI S. et al; Early lymphocyte recovery is an important determinant of outcome following allogenic transplantation with CD 34+ selected graft and limited T cell addback; Bone Marrow Transplantation, V 32, p.23-30, 2003.
9. CHAKRAVERTY R et al.; The role of antigen-presenting cells in triggering graft versus host disease and graft versus leukemia; V110; p.9-15; 2007.
10. CHANG Y et al.; Clinical impact of absolute lymphocyte count on day 30 after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation for pediatric patients with hematological malignancies; American Journal of Hematology; Letter, p.227-230; 2010.
11. CIUREA S. et al.; Lymphocyte recovery predicts outcome in cord blood and T cell depleted haploidentical stem cell transplantation; Biology of Blood and Marrow Transplantation, V17; p.1169-1175; 2010.
12. COPELAN E.; Hematopoietic Stem Cell Transplantation, New England Journal of Medicine, V354; p.1813-1826, 2006.
13. DEVERTTEN MARCEL et al.; Graft versus host disease: How to translate new insight into new therapeutic strategies; Biology of Blood and Marrow Transplantation; V10; p.815-825; 2004.
14. FERRARA JLM et al.; Biology of Blood and Marrow Transplantation , V5; p.346-356; 1999.
15. FOWLER D; Shared biology of GVHD and GVL effects: potential methods of separation; Critical Reviews in Oncology/Hematology; V 57; p.225-244; 2006.

16. GHRORASHIAN S et al.; T Cell engineering to enhance GVT and suppress GVHD; Best Practice and Research Clinical Haematology; V24; p.421-433; 2011.
17. HEINING C. et al; Lymphocyte reconstitution following allogenic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients; Bone Marrow Transplantation, V 39; p.613-622; 2007.
18. KIM D. et al; Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogenic stem cell transplantation, British Journal of Hematology; V125, p.217-224; 2004.
19. KOLB H.; Graft - versus - leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes; Blood Journal, V112, p.4371-4383, 2008.
20. KUMAR S. et al; Lymphocyte recovery after allogenic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia; Bone Marrow Transplantation, V17; p.1865-1870, 2003.
21. KUMAR S. et al; Effect of slow lymphocyte recovery and type of graft – versus-host disease prophylaxis on relapse after allogenic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia; Bone Marrow Transplantation, V 28, p.951-956, 2001.
22. KUMAR S. et al.; Lymphocyte recovery after allogeneic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia; Leukemia, V17; p.1865-1870, 2003.

23. LE BLANC K. et al.; Lymphocyte recovery is a major determinant of outcome after matched unrelated myeloablative transplantation for myelogenous malignancies; *Biology of Blood and Marrow Transplantation*; V15; p.1108-1115, 2009.
24. MACKALL C. et al; Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant recovery; *Bone Marrow Transplantation*, V44, p.457-462, 2009.
25. MK ISHAQI, Early lymphocyte recovery post-allogenic hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant graft-versus-leukemia effect without increase in graft-versus-host disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia; *Bone Marrow Transplantation*, V 41,p.245-252, 2008.
26. PAVLETIC ZS. et al; Lymphocyte reconstitution after allogenic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies; *Bone Marrow Transplantation*, V21, p.33-41, 1998.
27. RINGDEN O. et al; The allogenic graft versus cancer effect; *British Journal of Haematology*; V 147, p.614-633, 2009.
28. SANCHEZ-GUIJO F. et al.; Long term immune recovery of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: a comparison with their respective sibling donors; *Biology of Blood and Marrow Transplantation*; V 11; p.354-361; 2005.
30. SOCIÉ G et al.; Acute graft versus host disease: from bench to the bedside; *Blood Journal*, V114; p.43274335; 2009.

33. WELNIAK L. et al.; Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Annual Review Immunology, V25; p.139-140, 2007.

32. WILLIAMS K. et al; Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation; Best Practice and Research Clinical Haematology, V 21 (3); p.579-596; 2008.

33. WILLIAMS K et al.; Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation; Best Practice and Research Clinical Haematology; V21; p579-586; 2008.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

**Clinical impact of early absolute lymphocyte count after
allogenic stem cell transplantation**

Divisions Bone Marrow Transplantation

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Post Graduate Program on Clinical Sciences, Faculty Of Medicine

Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

Background: The role of repopulating lymphocyte after allogeneic stem cell transplantation (SCT) includes the prevention of serious infections and attacking residual tumor cells in the early post transplant phase. Therefore, the current study analysed the role of the absolute lymphocyte count (ALC) on day 21 and 30 after SCT in predicting transplant outcomes of patients in terms of the risk of transplant related mortality (TRM) in 100 days, overall survival (OS) in 5 years, disease free survival (DFS) in 5 years, non relapsed mortality (NRM), recurrence of original disease and risk of opportunistic infections.

Keywords: absolute lymphocyte count, allogeneic stem cell transplantation, lymphocyte recovery.

Hematopoietic stem cell transplantation (HCT) can be defined as a transfer of hematopoietic stem cells from one individual to another (allogenic HCT) or the return of previously harvested cells to the same individual (autologous HCT) after manipulation of cells and/or recipient. The goal of HCT is lifelong engraftment of administered cells, resulting in some or all of the recipient's lymphohematopoietic system being derived from the HCT graft. Full donor engraftment occurs when the recipient lymphohematopoietic system is fully replaced by progeny of the HCT graft. This is the ultimate goal of many protocols, especially for achieving optimal graft versus tumor activity in patients with malignant disease.

Allogenic HCT can cure or improve outcome in a wide variety of diseases, including leukemia, lymphoma, myeloproliferative disorders, myelodysplasia, bone marrow failure syndromes, congenital immunodeficiencies, enzyme deficiencies and hemoglobinopathies. However because allogenic HCT is associated with significant morbidity and mortality due to regimen-related toxicity, infection and graft versus host disease (GVHD), a recommendation regarding transplantation for the individual patient requires careful risk assessment that takes into account disease status, comorbidities, previous therapies, donor stem cell source and histoincompatibility

Classically, transfer of hematopoietic cell graft was seen as a means of rescuing the recipient's lymphohematopoietic system from an otherwise lethal myeloablative preparative regimen. In this model, the preparative regimen was used as the primary tool to eradicate malignant disease or to eradicate the recipient's immune system when HCT was used to treat benign diseases.

However, careful clinical studies over the last four decades have revealed that the effectiveness of allogeneic HCT in eradicating malignant disease is intimately linked to the activity of immunoreactive cells in graft, most notably T cells and, in some cases, natural killers (NK) cells.

The object of preparative regimen (called conditioning) is to eradicate cancer, create space in the host to receive the graft and to induce the immunosuppression that permits engraftment. The preparative regimen can also augment the antitumor immune response by causing breakdown of tumor cells, which results in a flood of tumor antigens into antigen-presenting cells. This flooding can lead to the proliferation of T cells, which attack the surviving malignant cells.

After the conditioning regimen the patient undergoes a profound period of pancytopenia which has been exposed to numerous infectious complications, whose duration may vary from days to weeks depending on the source of the stem cell donor. Simultaneously, myeloablative regimens damage mucosal surfaces and thereby provide a source for bloodstream seeding of commensal pathogens that inhabit the gastrointestinal tract. As a result, infectious complications in the immediate post transplant period usually present as febrile neutropenia, with the severity of risk related to the depth and duration of neutropenia and the degree of mucosal damage induced.

The hematopoietic reconstitution started by neutrophil, monocyte and NK-cell recovery is followed by platelet and red cell recovery, which is followed by B and T cell recovery.

Unlike the recovery of other hematopoietic lineages, which typically occur over the course of weeks after HCT, lymphocyte recovery is a prolonged process. Reestablishment of immunocompetence requires at least several months, and some patients continue to show immune deficits for several years after HCT. In general, NK-cells are the first lymphocyte subset to recover, followed by CD8+ T cells, which often reach supranormal levels within 2-8 months after HCT. Subsequently, B cells and ultimately CD4+ T cells recover. The pace and extent of recovery of each lymphocyte subset are highly dependent on several factors, which ultimately determine the degree extent and duration of immune incompetence experienced by individual HCT recipient.

The role of repopulating lymphocytes after allogeneic stem cell transplantation includes the prevention of serious infections and attacking residual tumor cells in the early post transplant phase. As such, a rapid recovery of the lymphocyte count after allogeneic HCT may reflect a lower transplant related mortality or affect the transplant outcome in terms of the rate of relapse. It is widely accepted that the immunological removal of tumor cells that have survived conditioning therapy post transplant is one of the most important mechanism in promoting a cure. Previous studies have also suggested that an earlier recovery of lymphocytes after allogeneic HCT is strongly associated with a lower relapse rate in patients with hematological malignancies.

Opportunistic infections in the early post-transplant phase are directly related to transplant –related death in an allogeneic setting, and it is well known that immune reconstitution plays a pivotal role in the protection against fatal

opportunistic infections after allogeneic HCT. Lymphocytopenia has already been accepted as the main risk factor in development of cytomegalovirus disease (CMV). Some researchers reported that the late appearance of repopulating T cells was associated with a high infection related mortality due to increased susceptibility to opportunistic infections.

A lower early absolute lymphocyte count (ALC) has also been associated with a higher non relapsed mortality (NRM), mainly due to graft versus host disease after allogeneic HCT. An early ALC could be regarded as an indicator that defines groups at high risk of opportunistic infection or relapse after allogeneic HCT.

The current study analysed the role of the ALC in day 21 and 30 after HCT in predicting the transplant outcome, as regards risk of opportunistic infections , death and recurrence of the original disease.

Materials and Methods

Transplantation procedure

A total of 273 patients who had undergone allogeneic stem cell transplantation at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brazil) between November 1994 and February 2011 were included in this retrospective study.

Sixty patients were excluded because they have hematologic benign diseases, thirty-one for refractory disease and twenty-four for failed engraftment. We excluded yet twelve patients for received thymoglobuline or alemtuzumab in conditioning regimen, corticosteroid in GVHD prophylaxis and the patient who had chronic myelogenous leukemia (36), lymphomas (12), chronic lymphocytic leukemia (1) and multiple myeloma (1).

The enrolled hematological diseases included acute myeloid leukemia (AML, $n = 50$, 27,9%), acute lymphoblastic leukemia (ALL, $n = 36$, 20,1%), mixed lineage acute leukemia ($n = 1$, 0,6%), myelodysplastic syndrome (MDS, $n = 13$, 7,3%).

The conditioning regimens consisted of busulfan + cyclophosphamide (BuCy $n = 45$), busulfan+ melphalan (BuMel $n = 17$), Cyclophosphamide +total body irradiation (Cy+TBI $n = 33$), fludarabine + melphalan (Flu+Mel $n = 5$). Myeloablative was adopted in 78 cases and non myeloablative in 22. Twelve patients received unmanipulated peripheral blood stem cells (PBSC) mobilized

with 10µg/kg/d granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), 3 cord blood unit and 85 bone marrow stem cells.

Objectives

Analyzed the absolute lymphocyte count in the D +21 and D +30 after hematopoietic stem cell transplantation. According to literature data set the we correlate the absolute lymphocyte count in the D +21D +30 below and above 300 these data with the rate of death, relapse rate, overall survival, disease-free survival in 5 years , transplant related mortality in 100 days and non relapsed mortality.

Definitions

The ALCs were checked on a daily basis after transplantation. The day of the stem cell infusion was defined as day 0. Engraftment was confirmed by peripheral blood counts (myeloid: peripheral absolute neutrophil count of more than $0,5 \times 10^9/l$; megakaryocyte: peripheral platelet count of more than $20 \times 10^9/l$ for at least three consecutive days without requiring transfusions).

Overall survival (OS) was defined as the time from transplantation until death of any cause. Disease free survival (DFS) was defined as the time from transplantation until relapse or death in complete remission, by whatever cause. In this article we define a 5 years period for DFS. The relapsed incidence was defined as the time from transplantation until relapse. Non relapse mortality (NRM) was defined as the time of transplantation until death from infectious or

GVHD related causes. In this article we define a 5 years period for NRM. TRM is the time from transplantation until death from infectious disease or related GVHD causes in a period of 100 days.

Statistics

Included in the study 100 patients with the following hematologic malignancies : acute myeloid leukemia, acute lymphocytic leukemia, secondary leukemia and myelodysplastic syndrome. Of these, 55 patients were male and 45 female. The average age was 27.9 years (minimum 9 months and maximum 55 years). The median follow-up was 601 days (95% CI 106-1845).

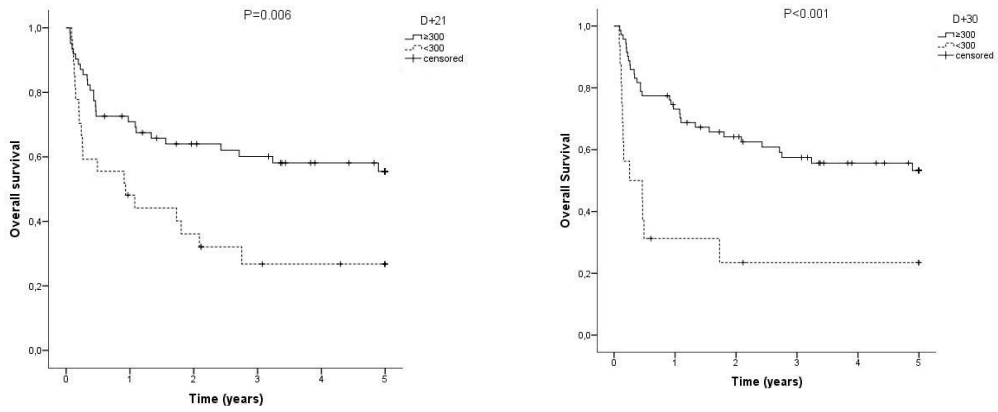
The CD 34 median that was infused was 4.0 (95% CI 2.4 to 5.7).The source of stem cells infused was 85% of bone marrow (BM), peripheral 12% (PBSC) and 3 % of umbilical cord blood (UCB).

Regarding the type of conditioning performed 22% were non myeloablative and 78% of lymphocytes were mieloablativos. The median of absolute lymphocyte count in the D +21 was 460 (95% CI 0 to 6250) and D +30 was 760 (95% CI 40-6370).

Regarding the rate of infections were observed 19% viral infections , bacterial in 65% and fungal in 17%.

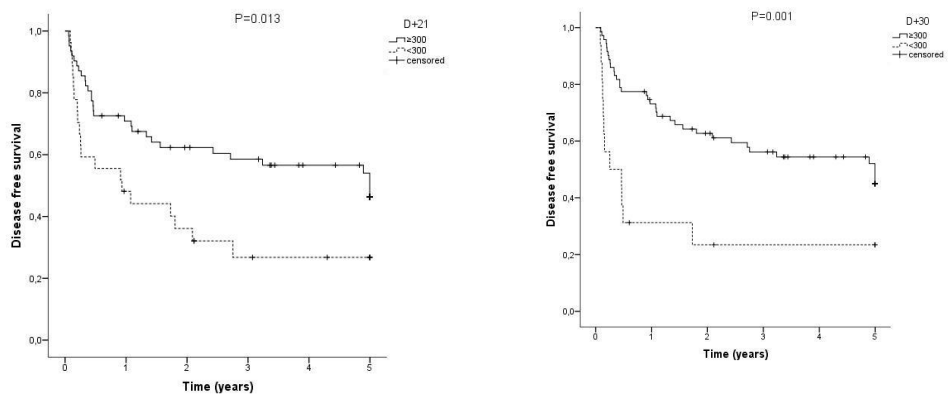
Overall survival (OS) at 5 years was 44%, disease-free survival (DFS) was 37.7%, transplant related mortality (TRM) in 100 days was 32.5%. Non relapsed mortality (NRM) at 5 years was 40.2%.

Figure 1: Overall survival on D+21 and D+30



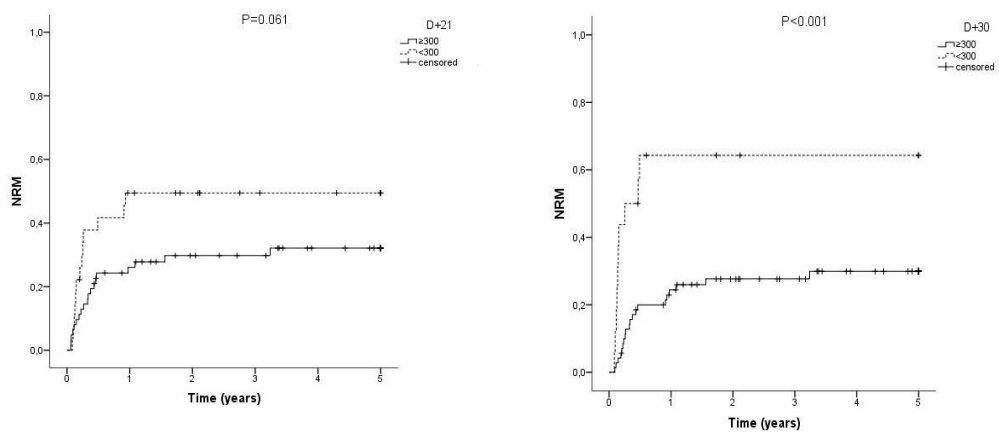
Source: Author

Figure 2: Disease free survival on D+21 and D+30



Source: Author

Figure 3: Non relapsed mortality on D+21 and D+30



Source: Author

The death rate found that 69% of patients who died at the D +21 had presented lymphocytes count below 300, and 43.9% were above 300 lymphocytes ($p < 0.05$).

Patients with counts less than 300 in D+30 presented 2.20 times risk of death when compared with those who presented values above 300 (95% CI 1.03 to 4.69) adjusted for GVHD and CD34. Patients presenting values less than 300 in 30 days have 3.76 times more risk of death in less than 100 days compared with those with values above 300 (95% CI 1.23 to 11.46).

Table 1. Frequency of death, death in less of 100 days, TRM e NRM.

	Death	P	Death < 100days	P	TRM	P	NRM	P
D21	1,32 (0,68-2,57)	0,414	2,00 (0,75-5,33)	0,165	2,00 (0,75-5,33)	0,404	1,19(0,56-2,56)	0,65
D30	2,20 (1,03-4,69)	0,042	3,76 (1,23-11,46)	0,020	3,76 (1,23-11,46)	0,020	1,96 (0,87-4,44)	0,10

Analyzing the rate of early relapse (<3 months of transplantation) in D +21 was 7% for patients with lymphocytes below 300, and 4.5% in those with lymphocytes above 300 ($p > 0.05$), already at D +30 was 6.3% in patients with lymphocytes below 300 and 5.3% above the 300 ($p > 0.05$). Early relapse, can be defined as that which occurs within 100 days after transplantation. We know that in this period only a small number of patients will relapse. Relapsed is more common at this stage with patients with refractory disease or with high minimal residual disease at the time of HSCT. We must remember that in this study, we

excluded patients with refractory disease and because these values were so low. To be able to measure this in a best effect, we need to have a larger n.

When we evaluated the rate of late recurrence of the underlying disease (> 3 months of transplantation), it was observed that in D +21 the rate of relapse was 25% in the group with less than 300 lymphocytes and 17% of lymphocytes in the group above 300 ($p > 0.05$). This finding would probably have a greater statistical significance if we could get a larger n of patients, however the vast majority of studies reviewed literature also finds it difficult to show statistical significance due to the small number of patients included in studies.

Another aspect was analyzing the correlation of the number of lymphocytes in the presence of acute and chronic GVHD. At the D +21, 76% of patients developed acute GVHD in the group of lymphocytes below 300 and 51.7% in the lymphocytes above 300 ($p < 0.05$). At the D +30 to acute GVHD was seen in 94% of patients with less than 300 lymphocytes and 50% in those with lymphocytes above 300 ($p < 0.05$). This association cannot be attributed to the use of corticosteroids, since we previously excluded patients who used corticosteroids as GVHD prophylaxis. Moreover, it was necessary to remove the use of multivariate analysis of steroids, because all patients in this sample who used steroids do not have acute GVHD, and thus the model cannot be built with these two variables together. This data is not evaluated frequently in the literature and in cases where it was described, is not mentioned if it was adjusted to the use of steroids. For this reason they have the potential to compromise the validity of data.

The data for the chronic GVHD statistic are not significant and are described in Table 2 and 3.

Table 2. Summary of data for D+21

<i>Variables</i>	<i>Lymphocyte<300</i>	<i>n</i>	<i>Lymphocyte>300</i>	<i>n</i>	<i>p</i>
Age	28,9 (± 15,5)	29	27,5 (± 16,1)	66	0,689
Relapse	25%	28	25,8%	66	0,999
Relapse < 3m	7,1%	28	4,5%	66	0,632
Acute GVHD	76%	25	51,7%	60	0,066
Chronic GVHD	33,3%	24	35,9	64	0,999
BM	89,3%	27	80%	65	0,459
Source					
PBSC	7,1%	2	16,9%	11	
UCB	3,6%	1	3,1%	2	
CD 34	3,3 (2,3-5,1)	27	4,4 (2,6-6,1)	64	0,081
Infections					
Bact	19 (65,5%)	29	43 (65,2)	66	0,999
Viral	7 (24%)	29	11 (16,7%)	66	0,568
Fungus	8 (27,6%)	29	9 (13,6%)	66	0,179

BM = Bone marrow; PBSC = peripheral blood stem cell; UCB = umbilical cord blood

Table 3. Summary of data for D+30

<i>Variables</i>	<i>Lymphocyte<300</i>	<i>n</i>	<i>Lymphocyte>300</i>	<i>n</i>	<i>P</i>
Age	26,2 ±16,2	17	28,5±15,8	76	0,593
Relapse	12,5%	16	28,9%	76	0,222
Relapse < 3m	6,3%	16	5,3%	76	0,999
Acute GVHD	94,1%	17	50,0%	66	0,003
Chronic GVHD	46,2%	13	34,2%	73	0,532
BM	76,5%	17	83,8%	74	0,094
Source					
PBSC	11,8%	2	14,9%	11	
UCB	11,8	2	1,4%	1	
CD 34	2,6 (2,0-7,3)	17	4,2 (2,6-5,7)	72	0,334
Infections					
Bact	58,8%	17	68,4%	76	0,635
Viral	23,5%	17	19,7%	76	0,744
Fungus	23,5%	17	14,5%	76	0,464

BM = Bone marrow; PBSC = peripheral blood stem cell; UCB = umbilical cord blood

Discussion

The main result of our study was to demonstrate an increased risk of death by 2.2 times at patients with lymphocytes below 300 in 30 days compared at patients with values above 300. With regard to early death (<100 days), the patients that have lymphocyte counts less than 300 in 30 days have a risk 3.76 times higher than compared with those with values above 300.

Furthermore, we note that although not significant, the rate of late recurrence (> 3 months) is also influenced by the number of lymphocytes, determining that those patients with lymphocytes below 300 at the D+21 and D +30 have higher a relapse rate compared to those with lymphocyte counts

above 300. This results could be improved in their statistically significant aspect if we could increase the sample. However, the role of early repopulating lymphocyte is unclear in terms of preventing relapse after allogeneic stem cell transplantation. According some authors, adequate lymphocyte reconstitution can effectively eliminate recipient haematopoieses in the early post-transplant phase, thereby reducing risk of relapse. Another explanation is that the natural killers cells activities, included in repopulating lymphocytes that mediate cytotoxicity without prior sensibilization, are responsible for an early graft versus leukemia effect after allogeneic stem cell transplantation, as the slow recovery of natural killers cells and T CD8+ lymphocyte in the early post transplant phase has been correlated with increase risk of relapse.

Interestingly, the group of patients with lymphocyte above 300 exhibited a lower incidence of acute GVHD compared with the group below 300. This finding may be related to the relatively low incidence of serious infections that can expose the antigenicity of GVHD target cells. However, no difference was noted in the incidence of chronic GVHD. This data are similar to those found in the literature.¹⁴

The prevention of fatal infection is essential to improve the overall survival outcome after allogeneic stem cell transplantation. As such, absolute lymphocyte count would seem to help in identifying a high risk of opportunistic infections after HSCT. Therefore, maximum efforts should be pursued with this group to prevent and monitor opportunistic infections, including extended antimicrobial, antiviral and antifungal prophylaxes. The fundamental way to overcome opportunistic infections and minimize the risk of relapse is to

persistently augment the immune functions. As such, the introduction of adjunctive therapy to augment the immune functions is beneficial, especially in patients with a low absolute lymphocyte count during the post transplant period, in order to minimize the mortality associated with opportunistic infections or recurrence of original disease after HSCT. As a possible strategy to augment the immune functions during the early post transplant period, prophylactic lymphocyte infusion may be help to overcome the susceptibility to infectious complications and minimize the risk of relapse after HSCT in high risk patient. Some investigators performed prophylactic donor lymphocyte infusions (DLI) to augment the GVL effect, especially in a non-myeloablative allogeneic setting for high risk patients. *Chakrabarti et al.*⁵ previously proposed the adoption of a prophylactic DLI in patients with unfavourable chromosomal abnormalities and low early absolute lymphocyte count. Another strategy to prevent relapse in a high risk group with early low absolute lymphocyte count is a rapid taper of immunosuppression, initiation of interferon or interleukins.

Finally, we note that with regard to overall survival and disease-free survival results are also favorable to groups that have a lymphocyte count above 300 on D +21 and D +30. Data from this study regarding NRM and TRM are consistent with those found in literature.

We know that early lymphocyte reconstitution is a sign of a rapid post transplant immune reconstitution, thus it is fundamental to survival of the patients undergoing to hematopoietic stem cell transplantation. As such, a rapid immune recovery, the lower will be the incidence of infectious complications

less chance of recurrence of the underlying disease and, consequently, less the mortality of these patients.

In conclusion, delayed lymphocyte recovery on day 21 and 30 after HSCT is a powerful predictor of death and relapsed post-HSCT. They help to identify patients at a significant risk for relapse or death early in the post-transplantation period to potentially allow targeted intervention by immunotherapy such as withdrawal of immunosuppressive medications or enhancing GVL effect to prevent relapse and improve survival. However, more studies are needed before we can consider it as a good prognostic tool.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFZAL S et al.; Early lymphocyte recovery after allogeneic hematopoietic SCT is associated with significant GVL effect in pediatric ALL but not acute myelogenous leukemia –update study; Bone Marrow Transplantation, V44; p. 799-804; 2009.
2. AULETTA JJ. et al; Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target; Bone Marrow Transplantation, V 35; p.835-857, 2005.
3. BÜLMANN L et al; Lymphocyte subset recovery and outcome after T cell replete allogeneic hematopoietic SCT; V46; p.1357-1362; 2011.
4. BURKE MJ et al.; Early lymphocyte recovery and outcomes after umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies; Biology of Blood and Marrow Transplantation, V17; p.831-840; 2011.
5. CHAKRABARTI S. et al; Early lymphocyte recovery is an important determinant of outcome following allogenic transplantation with CD 34+ selected graft and limited T cell addback; Bone Marrow Transplantation, V 32, p.23-30, 2003.
6. CHAKRAVERTY R et al.; The role of antigen-presenting cells in triggering graft versus host disease and graft versus leukemia; V110; p.9-15; 2007.

7. CHANG Y et al.; Clinical impact of absolute lymphocyte count on day 30 after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation for pediatric patients with hematological malignancies; American Journal of Hematology; Letter, p.227-230; 2010.
8. CIUREA S. et al.; Lymphocyte recovery predicts outcome in cord blood and T cell depleted haploidentical stem cell transplantation; Biology of Blood and Marrow Transplantation, V17; p.1169-1175; 2010.
9. COPELAN E.; Hematopoietic Stem Cell Transplantation, New England Journal of Medicine, V354; p.1813-1826, 2006.
10. DEVERTTEN MARCEL et al.; Graft versus host disease: How to translate new insight into new therapeutic strategies; Biology of Blood and Marrow Transplantation; V10; p.815-825; 2004.
11. FOWLER D; Shared biology of GVHD and GVL effects: potential methods of separation; Critical Reviews in Oncology/Hematology; V 57; p.225-244; 2006.
12. GHRORASHIAN S et al.; T Cell engineering to enhance GVT and suppress GVHD; Best Practice and Research Clinical Haematology; V24; p.421-433; 2011.
13. HEINING C. et al; Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients; Bone Marrow Transplantation, V 39; p.613-622; 2007.

14. KIM D. et al; Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogenic stem cell transplantation, British Journal of Hematology; V125, p.217-224; 2004.
15. KOLB H.; Graft - versus - leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes; Blood Journal, V112, p.4371-4383, 2008.
16. KUMAR S. et al; Lymphocyte recovery after allogenic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia; Bone Marrow Transplantation, V17; p.1865-1870, 2003.
17. KUMAR S. et al; Effect of slow lymphocyte recovery and type of graft – versus-host disease prophylaxis on relapse after allogenic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia; Bone Marrow Transplantation, V 28, p.951-956, 2001.
18. KUMAR S. et al.; Lymphocyte recovery after allogeneic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia; Leukemia, V17; p.1865-1870, 2003.
19. LE BLANC K. et al.; Lymphocyte recovery is a major determinant of outcome after matched unrelated myeloablative transplantation for myelogenous malignancies; Biology of Blood and Marrow Transplantation; V15; p.1108-1115, 2009.
20. MACKALL C. et al; Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant recovery; Bone Marrow Transplantation, V44, p.457-462, 2009.

21. MK ISHAQI, Early lymphocyte recovery post-allogenic hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant graft-versus-leukemia effect without increase in graft-versus-host disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia; Bone Marrow Transplantation, V 41, p.245-252, 2008.
22. PAVLETIC ZS. et al; Lymphocyte reconstitution after allogenic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies; Bone Marrow Transplantation, V21, p.33-41, 1998.
23. RINGDEN O. et al; The allogenic graft versus cancer effect; British Journal of Haematology; V 147, p.614-633, 2009.
24. SANCHEZ-GUIJO F. et al.; Long term immune recovery of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: a comparison with their respective sibling donors; Biology of Blood and Marrow Transplantation; V 11; p.354-361; 2005.
25. SOCIÉ G et al.; Acute graft versus host disease: from bench to the bedside; Blood Journal, V114; p.4327-4335; 2009.
26. WELNIAK L. et al.; Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Annual Review Immunology, V25; p.139-140, 2007.
27. WILLIAMS K. et al; Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation; Best Practice and Research Clinical Haematology, V 21 (3); p.579-596; 2008.

28.WILLIAMS K et al.; Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation; Best Practice and Research Clinical Haematology; V21; p579-586; 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal resultado do nosso estudo foi o de demonstrar um aumento do risco de óbito em 2,2 vezes nos pacientes com linfócitos abaixo de 300 no dia 30 quando comparados com os pacientes com valores acima de 300. No que se refere ao óbito precoce (< 100 dias), os pacientes que possuem contagens de linfócitos menores que 300 no dia 30 tem um risco de 3,76 vezes maior do que comparados com aqueles com valores acima de 300. Além disso, observamos que apesar de não ter sido significativa, a taxa de recaída tardia (> 3 meses) também é influenciada pelo número de linfócitos, determinando que aqueles pacientes com linfócitos abaixo de 300 no D+21 e no D+30 tem uma taxa de recidiva maior quando comparados aos com contagens de linfócitos acima de 300. Este dado poderia ter melhora na significância estatística se conseguíssemos um *n* maior de pacientes.

Por fim, observamos que no que se refere a sobrevida global e sobrevida livre de doença os resultados também são favoráveis aos grupos que possuem contagem de linfócitos acima de 300 no D+21 e no D+30. Os dados deste estudo referentes a NRM e a TRM são condizentes com os encontrados na literatura mundial.

Sabemos que a reconstituição linfocitária precoce é um sinal de uma rápida reconstituição imunológica no pós transplante. Sendo assim, ela é fundamental na sobrevida dos pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas, e quando mais rápido ela acontece, menor a incidência

de complicações infecciosas, menor a chance de recidiva da doença de base e, consequentemente, menor a mortalidade destes pacientes.

Tais resultados reforçam a necessidade de se identificar precocemente estes pacientes de forma a desenvolver estratégias para otimizar a reconstituição linfocitária para que possamos cada vez mais reduzir as complicações relacionadas a este procedimento e consequentemente, a mortalidade.

ANEXOS

METODOLOGIA

DELINEAMENTO DO ESTUDO:

Estudo coorte histórica.

PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM:

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Incluídos neste estudo os pacientes portadores das seguintes neoplasias hematológicas: Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), Leucemias Secundárias e Síndromes Mielodisplásicas (SMD) submetidos a transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (aparentado e não-aparentado) no período entre novembro 1994 a fevereiro de 2011 no Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre .

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Foram excluídos 60 pacientes portadores de doenças benignas submetidos a TCTH :Hemoglobinopatias , Anemia Aplástica , Imunodeficiências e Erros Inatos do Metabolismo;
- Foram retirados do estudo 66 pacientes portadores de doença de Hodgkin, Linfoma não Hodgkin, Leucemia mielóide crônica, Leucemia linfocítica crônica, Mielofibrose e Mieloma múltiplo ;

- Não fizeram parte deste estudo 31 pacientes portadores de doenças refratárias ao tratamento, pela elevada morbimortalidade do procedimento nestes casos e mínima chance de sucesso com o TCTH.
- Foram excluídos ainda 24 pacientes por apresentarem falha de pega (24), já que não há como avaliar a recuperação linfocitária do enxerto.
- Retirados ainda os 12 pacientes que fizeram uso de timoglobulina (imunoglobulina anti-linfócitos) e alentuzumabe no condicionamento, além de corticóide como profilaxia de DECH , pois tais medicações sabidamente atuam sobre o linfócito causando linfopenia.

A contagem linfocitária absoluta apresentada pelos pacientes no D+21 e no D+30 pós TCTH, foi obtida através dos registros médicos ou exames laboratoriais presentes nos prontuários destes pacientes. Por esta razão, foi estabelecido um ponto de corte de 300 linfócitos/ μL (ou $0,3 \times 10^9/\text{L}$) definido através dos dados publicados na literatura.^{18,22,25}

DEFINIÇÕES:

A contagem absoluta de linfócitos é obtida com base nos hemogramas realizados pelos pacientes diariamente após o transplante. O dia da infusão das células tronco é definido como dia zero (D0). A partir daí cada dia subsequente é acrescido de um sinal de + acompanhado do dia (por exemplo D+1, D+2, D+3....). A pega de neutrófilos é definida pela presença de mais de 500 neutrófilos em sangue periférico durante três dias consecutivos. A pega

plaquetária é definida pela contagem de plaquetas em sangue periférico superior a 20.000 sem necessidade de transfusões.

A definição de sobrevida global (OS) é o tempo transcorrido do transplante até o óbito por qualquer causa.

A sobrevida livre de doença (DFS) é definida como o tempo transcorrido do transplante até a recaída ou a morte em remissão completa por qualquer razão.

A mortalidade não relacionada a recaída (NRM) é definida como o tempo transcorrido do transplante até a morte por causa infecciosa ou relacionada ao DECH.

E por fim, a mortalidade relacionada ao transplante (TRM), é definida pelo tempo transcorrido do transplante até o óbito ocorrido nos primeiros 100 dias deste, por qualquer causa exceto recidiva. Atualmente é um conceito que vem caindo em desuso e gradativamente vem sendo substituído pela NRM.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi inicialmente digitado no programa Excel e exportado para o programa SPSS v.18.0 para a análise estatística.

As variáveis quantitativas foram descritas a pela média e desvio padrão quando a sua distribuição foi simétrica ou mediana e intervalo interquartil quando a distribuição foi assimétrica.

As variáveis de distribuição simétrica foram comparadas pelo teste de t de Student para as amostras independentes e as com distribuição assimétrica pelo teste de Mann-Whitney. Foi realizada a análise de sobrevida de Kaplan-Meier para avaliar os desfechos.

As variáveis categóricas forma descritas pela frequência absoluta e frequência relativa percentual e comparadas pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

As variáveis que se associavam com valores de linfócitos nos dias 21 e 30, consideradas na literatura como potenciais fatores de confusão foram incluídas em um modelo de análise multivariável de Regressão de Cox para ajuste dos mesmos. Fatores que apresentavam colinearidade foram excluídos da análise.

Foi definido um nível de significância de 5% para todas as análises estatísticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 293 pacientes que haviam sido submetidos a transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas no Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de novembro 1994 a fevereiro de 2011. Destes, foram excluídos 60 pacientes portadores de doenças hematológicas benignas submetidos a transplante alogênico de células tronco no período do estudo, 66 portadores de outras neoplasias hematológicas que não as do estudo, 31 pacientes portadores de neoplasias hematológicas refratárias, 24 pacientes que apresentaram falha de pega do enxerto e 12 pacientes por terem feito uso de alentuzumabe ou timoglobulina. Restaram ao final 100 pacientes.

Com relação aos diagnósticos analisados:

Leucemia linfocítica aguda 36 casos;

Leucemia mielóide aguda 50 casos;

Leucemia secundária 1 caso

Síndrome Mielodisplásica 13 casos

Fizeram parte deste estudo 100 pacientes que preenchem os critérios de inclusão, sendo destes 55 pacientes do sexo masculino e 45 do sexo feminino. A média de idade foi de 27,9 anos e o desvio padrão 15,6 anos

(mínima 9 meses e máxima 55 anos). A mediana do tempo de seguimento foi de 601 dias (intervalo interquartil : 106-1845).

A mediana de CD 34 infundidos foi de 4,0 (IC 95% 2,4-5,7) e quanto a origem destas células CD 34 infundidas 85% foram de medula óssea (MO), 12% periférica (PBSC) e 3% sangue de cordão umbilical (SCU).

Quanto ao tipo de condicionamento realizado 22% foram não mieloablativos e 78% mieloablativos.

A mediana de linfócitos no D+21 foi de 460 (intervalo interquartil: 0 - 6250) e no D+30 foi de 760 (intervalo interquartil: 40-6370).

Com relação a taxa de infecções observou-se do total das infecções 19% foram de etiologia viral, 65 % bacteriana e 17% fúngicas.

A sobrevida global (OS) em 5 anos foi de 44 % (sem categorizarmos pelo D+21 e D+30) com um tempo medido de 2,7 anos (IC 95% 2,23-3,15) e a sobrevida livre de doença (DFS) foi de 37,7% com um tempo medido de 2,6 anos (IC 95% 2,2-3,2), novamente sem categorizarmos por D+21 e D+30. Os dados referentes a categorização encontram-se nos gráficos abaixo:

Figura 3 – Gráfico de sobrevida global para o D+21 e D+30 de acordo com linfócitos < 300 e >300.

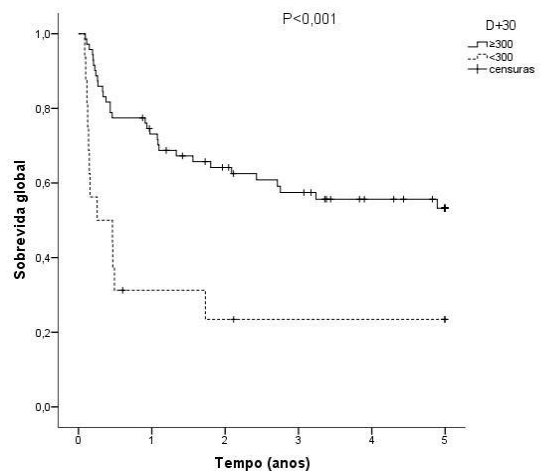
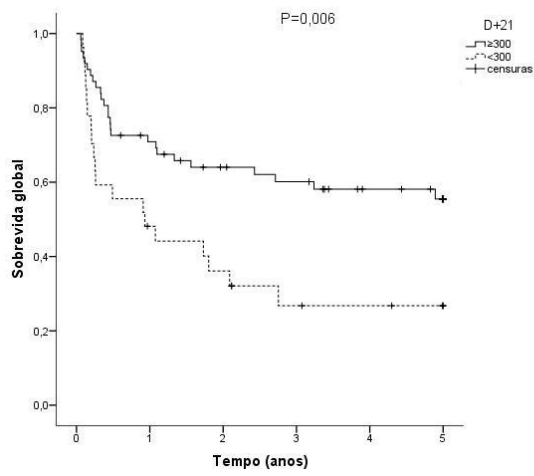


Figura 4 – Gráfico de sobrevida livre de doença para o D+21 e D+30 de acordo com linfócitos < 300 e >300.

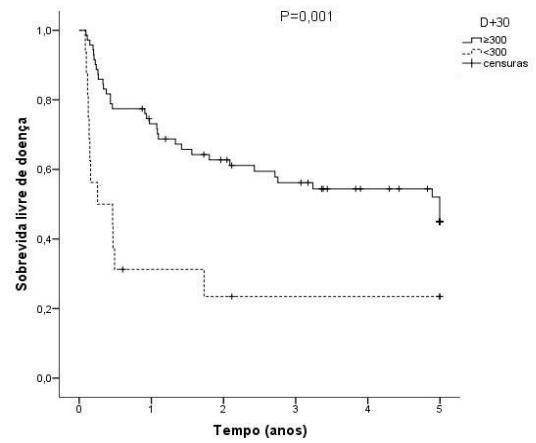
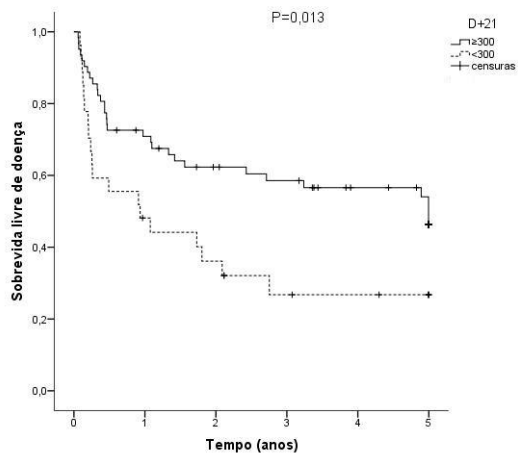
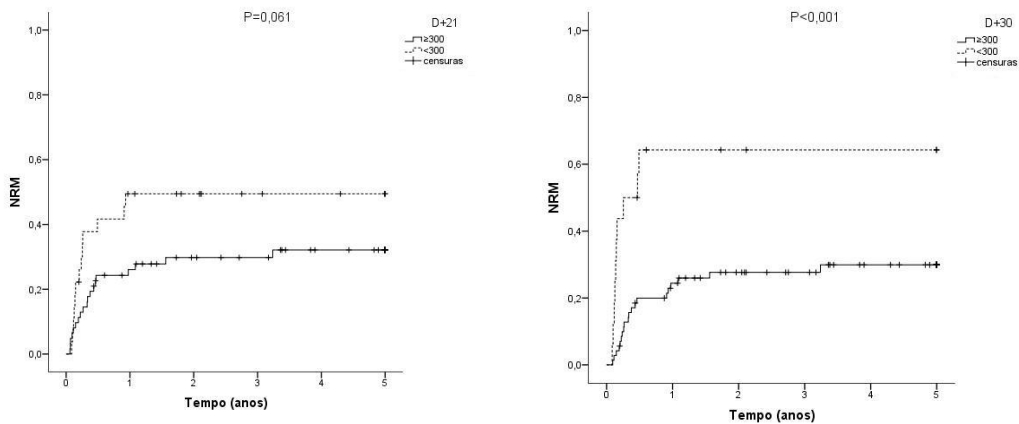


Figura 5 – Gráfico de mortalidade não relacionada a recaída para o D+21 e D+30 de acordo com linfócitos < 300 e >300.



Os gráficos deixam clara a associação de que quanto maior no número de linfócitos no D+21 e no D+30 melhor a sobrevida global e a livre de doença ($p < 0,05$). Estes dados são semelhantes aos demonstrados pela literatura.^{4,8,17,21,22,23,25,26,28}

A mortalidade relacionada ao transplante (TRM) em 100 dias foi de 32,5%. Já a mortalidade não relacionada a recidiva (NRM) em 5 anos foi de 40,2%.

Quando analisamos o desfecho óbito observamos que 69% dos pacientes que foram a óbito no D+21 tinham linfócitos abaixo de 300, e 43,9% tinham linfócitos acima de 300 ($p < 0,05$).

Quando comparados os grupos de pacientes com valores abaixo e acima de 300 no dia 21, observamos que houve diferença estatisticamente significativa na frequência de óbito e óbito em menos de 100 dias entre os

grupos como estão representados na Tabela 1. Porém ao realizarmos uma análise de Regressão de Cox ajustada para DECH e CD34, vemos que esta relação perde significância estatística, sendo a DECH a variável relacionada com os desfechos.

Quando comparados os grupos de pacientes com valores abaixo e acima de 300 no dia 30, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de óbito e houve diferença estatisticamente significativa para óbito em menos de 100 dias, entre os grupos como mostrado na tabela 1. Porém, ao realizarmos uma análise de Regressão de Cox ajustada para DECH e CD34, vemos que esta relação resulta estatisticamente significativa para óbito e óbito aos 100 dias. Pacientes com valores menores que 300 no dia 30 tem 2,20 vezes o risco de irem a óbito quando comparados com aqueles com valores acima de 300 (IC 95% 1,03-4,69) ajustado para DECH e CD34. Pacientes com valores menores que 300 no dia 30 tem 3,76 vezes o risco de irem a óbito em menos de 100 dias quando comparados com aqueles com valores acima de 300 (IC 95% 1,23-11,46) ajustado para DECH e CD34. Estes dados estão de acordo com os dados mostrados na literatura .

4,8,11,17,21,22,23,25,

Tabela 1. Frequência de óbito, óbito em menos de 100 dias, Mortalidade relacionada ao transplante em 100 dias (TRM) e mortalidade não relacionada a recidiva (NRM).

Fonte: Autor

	Obito	P	Obito 100 d	P	TRM	P	NRM	P
D21	1,32 (0,68-2,57)	0,414	2,00 (0,75-5,33)	0,165	2,00 (0,75-5,33)	0,404	1,19(0,56-2,56)	0,65
D30	2,20 (1,03-4,69)	0,042	3,76 (1,23-11,46)	0,020	3,76 (1,23-11,46)	0,020	1,96 (0,87-4,44)	0,10

Dados apresentados pelo HR (IC95%) e ajustados para CD34 e presença de Dech agudo

Quando analisamos a tabela 1, podemos observar que a TRM e o óbito em menos de 100 dias vemos que os resultados são semelhantes em função de que no óbito em menos de 100 dias tivemos apenas 1 paciente com recidiva e ao levarmos para a análise multivariável este dado não foi representativo.

Analisando a taxa de recidiva precoce (< 3 meses do transplante) no D+21 foi de 7% para os pacientes com linfócitos abaixo de 300, e de 4,5% naqueles com linfócitos acima de 300 ($p>0,05$), já no D+30 foi de 6,3% nos pacientes com *linfócitos abaixo de 300* e 5,3% nos *acima de 300* ($p>0,05$). Por definição, a recidiva precoce, pode ser definida como aquela que ocorre no período de 100 dias pós transplante. Sabemos que neste período apenas uma pequena porcentagem dos pacientes recaem, sendo mais comum a recidiva nesta fase daqueles pacientes com doença refratária ou com doença residual mínima elevada no momento do TCTH. Devemos lembrar que neste trabalho, foram excluídos os pacientes com doença refratária e por esta razão os valores encontrados foram tão baixos. Para conseguirmos medir melhor este efeito, deveríamos ainda ter um n maior.

Quando se avaliou as taxas de recidiva tardia da doença de base (> 3 meses do transplante), foi observado que no D+21 a taxa de recidiva foi de 25% no grupo com linfócitos abaixo de 300 e 17% no grupo de linfócitos acima de 300 ($p>0,05$). Este achado provavelmente teria uma maior significância estatística se conseguíssemos um *n* maior de pacientes, no entanto a grande maioria dos trabalhos revisados da literatura também encontra dificuldades em mostrar significância estatística em razão do número pequeno de pacientes incluídos nos estudos.^{8,21,25,26,}

Outro aspecto analisando foi a associação do número de linfócitos com a presença de DECH agudo e crônico. No D+21, 76% dos pacientes desenvolveram DECH *agudo no grupo de linfócitos abaixo de 300 e 51,7% no grupo de linfócitos acima de 300* ($p < 0,05$). Já no D+30 a presença de DECH *agudo foi vista em 94% dos pacientes com linfócitos abaixo de 300 e 50% naqueles com linfócitos acima de 300* ($p < 0,05$). Esta associação não pode ser atribuída ao uso de corticóide, uma vez que, foram excluídos os pacientes que faziam uso de corticóide como profilaxia de GVHD. Além disso, foi necessário retirar o uso de corticóide das análises multivariáveis, porque os pacientes da amostra estudada que usavam corticóide não apresentaram DECH agudo e, portanto, o modelo não pode ser construído com estas duas variáveis juntas. Este dado não é avaliado com frequência na literatura e nos casos onde foi descrito, não é mencionado se o mesmo foi ajustado para o uso de corticóide o que acaba comprometendo a validade dos dados.^{21,26}

Os dados para do DECH crônico não mostraram significância estatística e estão descritos na Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Descrição dos dados para o D+21

Fonte : Autor

<i>Variáveis</i>	<i>Linfócitos<300</i>	<i>n</i>	<i>Linfócitos>300</i>	<i>n</i>	<i>p</i>	
Idade	28,9 (± 15,5)	29	27,5 (± 16,1)	66	0,689	
Recaída global	25%	28	25,8%	66	0,999	
Recaída < 3m	7,1%	28	4,5%	66	0,632	
DECH agudo	76%	25	51,7%	60	0,066	
DECH crônico	33,3%	24	35,9	64	0,999	
MO	89,3%	27	80%	65	0,459	
Fonte	PBSC	7,1%	2	16,9%	11	
	SCU	3,6%	1	3,1%	2	
CD 34	3,3 (2,3-5,1)	27	4,4 (2,6-6,1)	64	0,081	
Infecção	Bact	19 (65,5%)	29	43 (65,2)	66	0,999
	Virus	7 (24%)	29	11 (16,7%)	66	0,568
	Fungo	8 (27,6%)	29	9 (13,6%)	66	0,179

Tabela 3. Descrição dos dados para o D+30

Fonte : Autor

Variáveis	Linfócitos<300	n	Linfócitos>300	n	P
Idade	26,2 ±16,2	17	28,5±15,8	76	0,593
Recaída global	12,5%	16	28,9%	76	0,222
Recaída < 3m	6,3%	16	5,3%	76	0,999
DECH agudo	94,1%	17	50,0%	66	0,003
DECH crônico	46,2%	13	34,2%	73	0,532
MO	76,5%	17	83,8%	74	0,094
Fonte					
PBSC	11,8%	2	14,9%	11	
SCU	11,8	2	1,4%	1	
CD 34	2,6 (2,0-7,3)	17	4,2 (2,6-5,7)	72	0,334
Infecção					
Bact	58,8%	17	68,4%	76	0,635
Virus	23,5%	17	19,7%	76	0,744
Fungo	23,5%	17	14,5%	76	0,464

TERMO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO PARA HOSPITALIZAÇÃO

Prezado Senhor/Senhora

Você ou o seu dependente é portador de uma doença de medula óssea (hematológica) grave. Considerando a evolução, mortalidade e morbidade de sua doença, atualmente, o Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoética ou, como mais conhecido, o *Transplante de Medula Óssea* é a melhor possibilidade terapêutica para sua condição podendo, dependendo da natureza e estágio de sua doença, não só prolongar o seu bem estar como também levar a sua cura.

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre é credenciado pelo Ministério da Saúde para realização deste procedimento através do Sistema Único de Saúde (SUS), sem nenhum custo para você ou sua família.

Você ou seu dependente apenas estará apto a ser submetido ao transplante após rigorosa avaliação psicossocial, odontológica, nutricional, clínica e laboratorial realizada no ambulatório especialmente organizado para

este fim. As instalações da sua residência ou a de seu dependente serão visitadas e possíveis reformas ou melhoramentos serão sugeridos pela equipe multiprofissional. Se, após esta avaliação, você ou seu dependente for considerado apto, seu nome entrará na lista de espera para o transplante.

Durante a realização do transplante você permanecerá internado na Unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoéticas localizada no 5º andar, ala Sul deste Hospital. Esta Unidade é especialmente preparada para você ou seu dependente tendo o seu ar filtrado e temperatura ambiente controlada. Nela trabalha uma equipe altamente treinada para o procedimento. Durante sua internação, devido as condições especiais desta Unidade, as visitas serão restritas à familiares próximos. O período mínimo de internação é de quatro semanas após a infusão das células tronco ou medula, podendo se estender de acordo com as freqüentes complicações que você ou seu dependente, podem apresentar no período imediato pós-TCTH.

Para que seja possível a realização do procedimento é necessário que o paciente tenha um bom acesso venoso. Portanto, será necessária a colocação de cateter venoso central, semi-implantável em grande veia localizada no seu pescoço. Esta colocação, é um procedimento cirúrgico e será feito pela equipe cirúrgica deste hospital e não é isenta de riscos. Os riscos são aqueles inerentes a qualquer punção venosa profunda e incluem: Sangramento, pneumotórax (perfuração do pulmão) e infecção. Estas complicações, no

entanto, não são frequentes e estão previstas pela equipe que está treinada para tratá-las. O período de permanência do cateter é de várias semanas, podendo se necessária sua troca, conforme avaliação da equipe médica. Através deste cateter serão infundidas a medula óssea, medicações endovenosas e transfusões (plaquetas, hemácias), além da coleta de sangue para realização de exames.

Para a realização do transplante, a sua medula óssea deverá ser destruída para ser substituída pela medula óssea de seu doador. Para isso são utilizadas medicações quimioterápicas em altas doses, e em alguns casos, radioterapia. Esse processo de destruição da medula óssea é chamado de *Condicionamento*. As complicações mais frequentes nesta fase são: Náuseas, vômitos, alopecia (queda dos cabelos), mucosite (feridas na boca), diarreia, febre, complicações neurológicas e a possibilidade de infertilidade duradoura, ocasionalmente irreversível.

Após o condicionamento você entrará na fase de aplasia, onde não será capaz de produzir os componentes sanguíneos. Nesta fase você será incapaz de se defender dos microrganismos, por isto necessita estar na Unidade Especial para transplantes. Você pode apresentar infecções graves, com risco de vida. A equipe assistencial está preparada e tem experiência em tratar tais complicações. Também durante esta fase serão necessárias transfusões frequentes (hemácias e plaquetas), devido a anemia e ao risco de

hemorragias. Alguns pacientes raramente podem apresentar falha de pega da medula, com necessidade de novo transplante. Esta complicação é pouco freqüente e ocorre mais nos transplantes não aparentados (com doador proveniente dos registros Nacional e Internacional de doadores de medula óssea).

Em caso de complicação grave você poderá ser transferido para o Centro de Terapia Intensiva (CTI) deste hospital, onde nossa equipe estará presente e tratando de você ou de seu dependente, até que as condições clínicas permitam a volta para a unidade de transplante.

Após a recuperação da medula você ou seu dependente poderá apresentar Doença do Enxerto contra Hospedeiro, que consiste na reação das células do doador contra o seu organismo. Algumas vezes isto é necessário para um melhor controle ou para a cura da doença pela qual você foi submetido ao transplante. Por outro lado, embora menos frequentemente, esta complicação poderá tornar-se grave. Para evitar a doença do enxerto contra o hospedeiro grave, você estará recebendo medicações imunossupressoras. Essas medicações têm como efeito uma redução na sua imunidade (células de defesa), o que o deixará mais suscetível a infecções. Para evitar estas infecções umas séries de medidas serão adotadas. Sua colaboração e de sua família é essencial para o sucesso do procedimento respeitando as orientações e fazendo uso correto das medicações prescritas.

Você permanecerá internado até a recuperação da medula e enquanto necessitar de cuidados clínicos mais intensos. Conforme sua evolução, após a recuperação da medula, mas ainda com necessidade de medicações endovenosas, você ou seu dependente poderá ser transferido para o Hospital Dia. Esta unidade funciona como uma unidade de internação, onde o paciente recebe as medicações endovenosas e realiza exames ou procedimentos médicos, podendo retornar para sua casa, ou para o local onde estiver hospedado.

Devido as complicações acima citadas, o risco de morte desde o momento do transplante até aproximadamente 180 dias após o procedimento, é de 25 a 30%. Em transplantes onde o doador não é familiar este risco aumenta para cerca de 40%. Você só está sendo encaminhado ao transplante porque o risco de morte decorrente da sua doença é bem maior que o risco de morte do transplante. Para reduzir este risco uma série de medidas, exames e medicações serão utilizadas. Sua adesão a estas medidas é essencial para a redução destes riscos.

Como rotina deste programa de transplante, para que possamos sempre evoluir com um melhor entendimento das complicações relacionadas a este

procedimento, os pacientes submetidos ao transplante que evoluírem ao óbito, serão submetidos a necropsia.

Após a alta podem ocorrer complicações tardias obrigando a reinternação. Geralmente são decorrentes de infecções e da doença do enxerto contra hospedeiro crônica (cerca de 25 a 30% dos pacientes apresentam esta doença). Para controlar esta complicação você poderá ter que utilizar por um período maior os imunossupressores (corticoides, ciclosporina ou tacrolimus), permanecendo vulnerável a infecções e, portanto tomando todos os cuidados que lhe forem prescritos. As medicações necessárias nesta fase podem apresentar efeitos colaterais como hipertensão arterial (aumento da pressão arterial), diabetes (aumento da glicose no sangue), problemas nos rins e aumento de peso. Todos estes efeitos serão controlados com medicamentos e desaparecerão quando os imunossupressores forem suspensos ou sua dose poder ser diminuída.

Durante todo o período de acompanhamento após o transplante você ou seu dependente receberão instruções da equipe, realizarão exames periódicos e receberão prescrições de medicamentos, quando necessários, para reduzir o risco de infecções e de complicações tardias.

O transplante de medula óssea é realizado por um grupo multidisciplinar formado por médicos, odontólogos, enfermeiros, psicólogos e assistentes sociais especificamente treinados para este fim. Esses profissionais o acompanharão a partir deste momento, durante todo o período de transplante e após a sua alta. Todos estes profissionais são remunerados pelo hospital. Você não deverá em momento algum fazer pagamento de honorários a nenhum destes profissionais enquanto estiver sendo atendido neste hospital. Os custos integrais do transplante serão pagos pelo SUS, assim como os medicamentos necessários no período após a alta. É desnecessário e não serão utilizados recursos adicionais que, por ventura, a família ou o paciente disponha ou que sejam obtidos através de campanhas populares.

As informações clínicas e resultado de exames realizados durante o período do transplante e após a sua alta poderão ser utilizados posteriormente para realização de trabalhos científicos. As informações coletadas serão tratadas de maneira confidencial e será garantido seu anonimato.

Eu _____
declaro que fui informado pelo
Dr(a) _____ sobre meu
diagnóstico ou de meu dependente
_____, da necessidade de um
transplante alogênico de medula óssea, sobre o procedimento e seus
riscos.

Compreendi e aceito ser hospitalizado na unidade de transplante
alogênico deste hospital, aceitando os riscos de complicações
secundárias a este tratamento, as quais me foram relatadas.

Aceito também que os dados clínicos e laboratoriais observados
durante e após o meu transplante sejam utilizados para trabalhos
científicos sendo garantido meu anonimato e a confidencialidade dos
dados.

Porto Alegre _____ de _____ de 20__.

Paciente: _____.

Responsável: _____.

Médico Assistente: _____.

Testemunhas: _____ e
_____.

FICHA DE COLETA DE DADOS

REGISTRO: _____ NOME: _____

-

DATA NASC: _____ IDADE: _____ SEXO: _____ DIAGNÓSTICO: _____

DATA: _____ TIP SANG: _____ STATUS DA DOENÇA PRÉ-TCTH: _____

CMV: _____ HBV: _____ HCV: _____ HIV: _____

HTLV: _____ COMORBIDADES: _____

DOADOR

DOADOR: _____ SEXO: _____ TIP SANG: _____ IDADE: _____

CMV: _____ HBV: _____ HCV: _____ HTLV: _____ HIV: _____

HLA: _____ FONTE CTH: _____

TCTH

DATA TCTH: _____ CD34/KG: _____

COND: _____ TBI: _____ PEGA: _____ DATA: _____ NEUT: _____

PLAQ: _____

FILGRASTIMA: _____

COMPLICAÇÕES: _____ DATA: _____

MUCOSITE: _____ DECH: _____

PROF DECH: _____ AGUDO: _____ () PELE () FIGADO () TGI

DATA: _____ RESP. CORTICÓIDE: _____

TTO: _____ RESPOSTA: _____

CRÔNICO: _____ EXTENSÃO: _____ DATA: _____ TTO: _____ RESP: _____

INFECCÕES

QUAL? _____ TTO: _____

EXAMES

LINFÓCITOS – INFUSÃO: _____ D+21: _____ D+30: _____

RECAÍDA

SIM/NÃO: _____ DATA: _____

DLI: _____

RESPOSTA A DLI: _____

ÓBITO :SIM/NÃO: _____ DATA: _____ CAUSA MORTIS: _____

REL TCTH: _____

DATA DA ÚLTIMA AVALIAÇÃO: _____

RESPOSTAS

- 1) SIM
- 2) NÃO
- 3) DESCONHECIDO

- 13) OUTROS
- 14) MIELOFIBROSE
- 15) IMUNODEFICIENCIAS

DIAGNÓSTICO:

- 1) LLA
- 2) LMA
- 3) LA SECUNDÁRIA
- 4) SMD
- 5) LMC
- 6) LLC
- 7) LNH
- 8) LH
- 9) MM
- 10) TUMOR SÓLIDO
- 11) AA
- 12) HEMOGLOBINOPATIA

HLA

- 1) COMPATÍVEL RELACIONADO
- 2) GEMEO MONOZIGÓTICO
- 3) COMPATÍVEL NÃO RELACIONADO
- 4) MISMATCH RELACIONADO
- 5) MISMATCH NÃO RELACIONADO

CONDICIONAMENTO

- 1) CICLOFOSFAMIDA
- 2) MELFALAN
- 3) BUSSULFAN
- 4) ARA-C
- 5) ETOPOSIDE

- 6) TIMOGLOBULINA (ATG)
- 7) FLUDARABINA
- 8) METILPREDNISOLONA
- 9) ALENTUZUMABE
- 10) RITUXIMABE

PROFILAXIA / TRATAMENTO DECH

- 1) NENHUMA
- 2) CICLOSPORINA
- 3) METOTREXATO
- 4) TACROLIMUS
- 5) SIROLIMUS
- 6) CORTICÓIDE
- 7) RITUXIMAB
- 8) BASILIXIMAB
- 9) INFLIXIMAB
- 10) MMF
- 11) TALIDOMIDA

INFECÇÕES

- 1) BACTERIA
- 2) VIRUS
- 3) FUNGO
- 4) DESCONHECIDO
- 5) SEM INFECCAO

COMPLICAÇÕES

- 1) PNEUMONITE INTERSTICIAL
- 2) VOD
- 3) CISTITE HEMORRÁGICA
- 4) SARA
- 5) MUCOSITE
- 6) OUTRAS

CRITÉRIO	PONTUAÇÃO
IDADE NO TCTH <20 ANOS - 0 20-40 ANOS - 1 >40 ANOS - 2	
ESTÁGIO DA DOENÇA PRECOCE – 0 INTERMEDIÁRIO – 1 TARDIO - 2	
INTERVALO DIAG/TCTH <12 MESES – 0 >12 MESES - 1	
TIPO DE DOADOR MRD – 0 MUD - 1	
COMBINAÇÃO D/R OUTROS – 0 D:M/R:H - 1	
SOROLOGIA CMV (+/-) DOADOR RECEPTOR	
ESCORE DE KARNOFSKY	