**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

JULIANA BERNARDES ELIAS DIAS

**Comprimento telomérico dos leucócitos do sangue
periférico de doadores e receptores de transplante de
medula óssea para anemia aplástica grave: associação
com resultados clínicos após o transplante**

RIBEIRÃO PRETO

2015

JULIANA BERNARDES ELIAS DIAS

**Comprimento telomérico dos leucócitos do sangue
periférico de doadores e receptores de transplante de
medula óssea para anemia aplástica grave: associação
com resultados clínicos após o transplante**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Oncologia Clínica,
Células-Tronco e Terapia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins
Calado de Saloma Rodrigues**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o
Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

RIBEIRÃO PRETO

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Juliana Bernardes Elias

Comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico de doadores e receptores de transplante de medula óssea para anemia aplástica grave: associação com resultados clínicos após o transplante. Juliana Bernardes Elias Dias / Orientador: Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues. Ribeirão Preto, 2015.

120p.: 19il.; 30 cm

Disertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

1. Telômero; 2. Anemia aplástica; 3. Transplante de medula óssea; 4. Falha de enxertia; 5. Doença do enxerto contra hospedeiro, 6. Sobrevida global.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Juliana Bernardes Elias Dias

Título: Comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico de doadores e receptores de transplante de medula óssea para anemia aplástica grave: associação com resultados clínicos após o transplante.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura	_____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Tocantins Calado, pela oportunidade, confiança e pelos ensinamentos sobre pesquisa científica na área de Hematologia.

À Prof^a. Dr^a. Belinda Simões e Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Oliveira Rodrigues, pelos ensinamentos e pela experiência transmitidos ao longo dos anos de convívio na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À equipe de Transplante de Medula Óssea e ao Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela participação e colaboração durante a realização deste estudo. Em especial ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini, à Prof^a. Dr^a. Carmem Bonfim e Dr^a. Larissa Medeiros.

A todos da equipe de TMO do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio, carinho e pela atenção. Ao Dr. Fabiano Pieroni, pelo estímulo e pela ajuda na realização deste estudo. À Dra. Daniela Moraes, Dr^a. Ana Beatriz Stracieri, ao Dr. Renato Guerino Cunha, Dr. Luis Guilherme Darrigo Junior e Dr. Carlos Grecco, pelo apoio e pela compreensão.

Ao pessoal do Laboratório de Hematologia, em especial à Bárbara, Rita e Júlia, pelo apoio e pela paciência na concretização deste estudo.

À equipe de Laboratório de HLA da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela gentileza no fornecimento de amostras para o estudo.

Aos pacientes transplantados e doadores de medula óssea, por consentirem participar da pesquisa em prol de benefícios para a Ciência.

Aos meus pais, Sérgio e Maria Célia pelo carinho, incentivo e pela compreensão. Obrigada pelo exemplo de perseverança na concretização de nossos sonhos. Aos meus irmãos André e Sérgio, mesmo à distância, sempre dando palavras de apoio.

Ao Joel, por compartilhar momentos de vida junto com nosso filho Pedro Henrique. À D. Neusa, por cuidar carinhosamente de Pedro Henrique.

Aos meus avós Hugo e Neusa, por ter a oportunidade de conhecer suas histórias de vida, de luta e coragem! Vovô Hugo, obrigada por ser fonte de inspiração como pessoa e profissional médico.

A Deus, por nos guiar durante nossa trajetória de vida.

Ser feliz
é ter sintonia com Deus
é saber amar
saber viver cada dia e olhar
em sua volta e não enxergar
só os problemas
é dar um lindo sorriso e dizer
“Obrigado meu Deus, por mais um dia”!

(autor desconhecido)

Resumo

DIAS, J.B.E. **Comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico de doadores e receptores de transplante de medula óssea para anemia aplástica grave: associação com resultados clínicos após o transplante.** 120f. 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

- Telômeros são sequências de nucleotídeos que selam o final dos cromossomos, protegendo-os de danos. O reparo telomérico defeituoso nas células-tronco hematopoéticas pode desencadear doenças graves relacionadas à falência das células-tronco, como a anemia aplástica grave (AAG) congênita ou adquirida. Para os pacientes menores de 40 anos, com doador HLA (antígeno leucocitário humano - do inglês: *Human leukocyte antigen*) idêntico, o transplante de medula óssea (TMO) alogênico é considerado terapia de primeira linha. A resposta ao TMO depende da ocorrência ou não de complicações relacionadas ao tratamento como: falha de enxertia, doença do enxerto contra o hospedeiro, toxicidade relacionada ao TMO. O comprimento telomérico é um marcador de senescência e capacidade replicativa das células. Dessa forma, o estudo do comprimento telomérico é oportuno no ambiente de alta proliferação celular como o transplante. O presente estudo incluiu sessenta e seis pacientes, que realizaram TMO alogênico para AAG e seus doadores relacionados ou não relacionados que apresentavam amostras de DNA avaliáveis pré-transplante, entre 1992 e 2014, em dois centros de TMO. O comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico de receptores e doadores pré-TMO foram avaliados pelo método *real-time polymerase chain reaction* (qPCR) e classificados em tertis. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação do comprimento telomérico ajustado para idade de doadores e receptores de TMO para AAG com os desfechos clínicos após o transplante. Não houve associação entre o comprimento telomérico do receptor e do doador e enxertia de neutrófilos e plaquetas, doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) crônica, falha de enxertia tardia, toxicidade relacionada ao TMO e sobrevida global. Em estudo prévio, o telômero curto do paciente com AAG foi associado com menor sobrevida global e maior recaída da doença durante o tratamento imunossupressor. No presente estudo, não houve associação entre menor comprimento telomérico do receptor e doador e menor sobrevida global no contexto de TMO alogênico para AAG em sua maioria com doadores relacionados. Em conclusão, o TMO alogênico relacionado permanece como melhor opção terapêutica para os pacientes jovens com diagnóstico de AAG e presença de telômero curto.

Palavras-chave: Telômero, Anemia aplástica, Transplante de medula óssea, Falha de enxertia, Doença do enxerto contra hospedeiro, Sobrevida global.

Abstract

DIAS, J.B.E. Telomere length of peripheral blood leukocytes of hematopoietic stem cell transplant donors and recipients for severe aplastic anemia: association with clinical outcomes after transplantation. 120p. 2015. Dissertation (Master) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Telomeres are nucleotide repeats at the ends of the chromosomes, protecting them from damage and shortening. The defective telomere repair in hematopoietic stem cells can trigger serious diseases related to the bone marrow failure, such as severe aplastic anemia (SAA) congenital or acquired. Aplastic anemia is characterized by peripheral blood cytopenias and reduction of progenitors in bone marrow. For patients younger than 40 years, with identical HLA donor, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is considered first-line therapy. The outcomes of HSCT depend on the occurrence of treatment-related complications such as graft failure, graft-versus-host disease and toxicities related HSCT. The telomere length is a marker of senescence and replicative capacity of cells. Thus, the evaluation of telomere length is appropriate in high proliferation as cell transplantation environment. This study included sixty six consecutive patients underwent HSCT for SAA and donors who had pre - HSCT blood samples from two centers between 1992 and 2014. Recipient and donor pre - HSCT blood leukocytes telomere length were measured by real – time quantitative PCR and classified into tertiles. The aim of this study was to evaluate the association between age adjusted recipient and donor telomere length with clinical outcomes after transplantation. There was no association between donor and recipient telomere length and neutrophil and platelet engraftment, chronic graft-versus-host disease (GVHD), late graft failure and overall survival. In a previous study, the short telomere length patient with AAG receiving immunosuppressive therapy was associated with risk of relapse and overall survival. In this study, there was no association between recipient and donor short telomere length and overall survival in allogeneic HSCT for AAG (mostly related donors). In conclusion, HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia and short telomere remains the standard treatment.

Keywords: Telomere, Aplastic anemia, Hematopoietic stem cell transplantation, Neutrophil and platelet engraftment, Late graft failure, Graft versus host disease, Overall survival.

Lista de Figuras

Figura 1:	Estrutura e função do complexo da telomerase	24
Figura 2:	Mutações gênicas no complexo da telomerase e doenças humanas associadas.....	26
Figura 3:	Critérios de elegibilidade para inclusão no estudo.....	44
Figura 4:	Amostras de DNA em grupos de receptor e doador de MO em gel de agarose a 1%	47
Figura 5:	Representação da curva de regressão linear do comprimento telomérico de acordo com a idade.....	48
Figura 6:	Distribuição dos valores T/S ajustado para a idade de receptores e doadores de MO por centro transplantador.....	49
Figura 7:	Representação <i>box plot</i> da distribuição dos valores T/S entre receptores e doadores de MO do centro de Ribeirão Preto e Curitiba	49
Figura 8:	Representação da curva de regressão linear dos valores T/S padronizado do banco controle de acordo com a idade	50
Figura 9:	Representação <i>box plot</i> da distribuição do comprimento telomérico por faixa etária entre receptores e doadores de MO	58
Figura 10:	Incidência acumulada de enxertia de neutrófilos e plaquetas após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor	62
Figura 11:	Incidência acumulada de DECH aguda após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor...	63
Figura 12:	Incidência acumulada de crônica após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor	64
Figura 13:	Incidência acumulada de falha de enxertia após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor	66
Figura 14:	Probabilidade de sobrevida global após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor...	68
Figura 15:	Incidência acumulada de enxertia de neutrófilos e plaquetas após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador	72
Figura 16:	Incidência acumulada de DECH aguda após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador.....	73

- Figura 17:** Incidência acumulada de crônica após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador 74
- Figura 18:** Incidência acumulada de falha de enxertia após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador 76
- Figura 19:** Probabilidade de sobrevida global após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador..... 78

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes transplantados para anemia aplástica grave no HCRP e HCPR	55
Tabela 2: Desfechos clínicos após TMO alogênico em pacientes com anemia aplástica no HCRP e HCPR	57
Tabela 3: Características clínicas dos pacientes transplantados para anemia aplástica por tertis de comprimento telomérico do receptor ajustado para idade	59
Tabela 4: Características clínicas dos pacientes transplantados para anemia aplástica por tertis de comprimento telomérico do doador ajustado para idade	69
Tabela 5: Comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico do receptor e do doador: associação com os desfechos clínicos após o TMO	79

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AA-	Anemia aplástica
AAG-	Anemia aplástica grave
APC-	Células apresentadoras de antígenos
ATG-	Globulina antitimócito
BU-	Bussulfan
CB-	Cordão umbilical
CIBMTR-	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
CPH-	Células progenitoras hematopoéticas
CRs-	Regiões conservadas
CSA-	Ciclosporina
CY-	Ciclofosfamida
DECH-	Doença do enxerto contra hospedeiro
DNA-	Ácido desoxirribonucléico (<i>do inglês deoxyribonucleic acid</i>)
EBMT-	<i>European Group for Blood and Marrow Transplantation</i>
FCA-	FLU-CY-ATG (Fludarabina - Ciclofosfamida - Globulina antitimócito)
Flow-FISH-	<i>Flow cytometry with fluorescence in situ hybridization</i>
FLU-	Fludarabina
GAL-	Globulina antilinfocitária
G-CSF-	Fator de crescimento de granulócitos
GVHD-	<i>Graft-versus-host disease</i>
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HC-UFPR-	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HLA-	Antígeno leucocitário humano (<i>do inglês: Human leukocyte antigen</i>)

HPN-	Hemoglobinúria paroxística noturna
HR-	<i>Hazard ratio</i>
IC-	Intervalo de confiança
IFN-gama-	Interferon-gama
MHC-	Complexo principal de histocompatibilidade
MO-	Medula óssea
MSC-	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NIH-	<i>National Institutes of Health</i>
OR-	<i>Odds ratio</i>
PB-	<i>Peripheral Blood</i>
PCR-	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QIAmp-	Técnica de coluna de membrana
qPCR-	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
SG-	Sobrevida global
SOS-	Síndrome de obstrução sinusoidal
STAT3-	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TBI-	<i>Total Body Irradiation</i>
TCR-	<i>T cell receptor</i>
TEN-	<i>N-Terminal Essencial</i>
TERC-	<i>Telomerase RNA component</i>
TERT-	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TMO	Transplante de Medula Óssea
TNF-	<i>Tumoral Necrosis Factor</i>
TRM-	<i>Transplant Related Mortality</i>

VEGF- Fator de crescimento vascular endotelial

VNTR- *Variable number of tandem repeat*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Telômero.....	23
1.1.1. Biologia do Telômero.....	23
1.1.2. Telomeropatias associadas à falência medular óssea	24
1.2. Anemia aplástica	26
1.2.1. Anemia aplástica: definição e critérios diagnósticos.....	26
1.2.2. Fisiopatologia da anemia aplástica adquirida.....	27
1.2.3. Anemia aplástica: terapêutica.....	28
1.3. Transplante de medula óssea alogênico doador relacionado para anemia aplástica grave ...	30
1.3.1. Avaliação do tipo de fonte células tronco hematopoéticas.....	30
1.3.2. Regime de condicionamento	31
1.4. Transplante de medula óssea alogênico doador não relacionado para anemia aplástica grave.....	32
1.4.1. Tipo de fonte de células-tronco	32
1.4.2. Regime de condicionamento	32
1.5. Transplante de cordão umbilical doador não relacionado para anemia aplástica grave	33
1.6. Transplante haploidêmico doador relacionado para anemia aplástica grave	33
1.7. Complicações após o transplante de medula óssea alogênico.....	34
1.7.1. Falha de enxertia primária e secundária	34
1.7.2. Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e crônica	34
1.7.3. Mucosite	35
1.7.4. Síndrome da obstrução sinusoidal	36
 2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	 37
 3. OBJETIVOS.....	 40
3.1. Objetivo geral	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
 4. MATERIAL E MÉTODOS	 42
4.1. Delineamento do estudo.....	43
4.2. Pacientes e critérios de elegibilidade	43
4.3. Definições do estudo, variáveis e desfechos clínicos analisados.....	44
4.4. Avaliação do comprimento telomérico.....	45
4.5. Análise Estatística.....	47
 5. RESULTADOS	 53
5.1. Resultados Clínicos.....	54
5.2. Comprimento telomérico em receptores e doadores pré TMO.....	58
5.2.1. Comprimento telomérico do receptor e variáveis clínicas pré-TMO.....	58
5.2.2. Comprimento telomérico do receptor e desfechos clínicos após o TMO.....	61
5.2.2.1. Comprimento telomérico do receptor e enxertia de neutrófilos e plaquetas	61
5.2.2.2. Comprimento telomérico do receptor e DECH	62
5.2.2.3. Comprimento telomérico do receptor e falha de enxertia tardia	64
5.2.2.4. Comprimento telomérico do receptor e toxicidade relacionada ao TMO	67

5.2.2.5. Comprimento telomérico do receptor e sobrevida global	67
5.2.3. Comprimento telomérico do doador e variáveis clínicas pré TMO	68
5.2.4. Comprimento telomérico do doador e desfechos clínicos após o TMO.....	71
5.2.4.1. Comprimento telomérico do doador e enxertia de neutrófilos e plaquetas	71
5.2.4.2. Comprimento telomérico do doador e DECH	72
5.2.4.3. Comprimento telomérico do doador e falha de enxertia tardia	74
5.2.4.4. Comprimento telomérico do doador e toxicidade relacionada ao TMO	77
5.2.4.5. Comprimento telomérico do doador e sobrevida global.....	77
6. DISCUSSÃO.....	80
6.1. Avaliação do comprimento telomérico: associação com o TMO alogênico para anemia aplástica	81
6.1.1. Avaliação do comprimento telomérico: associação com a enxertia após o TMO.....	82
6.1.2. Avaliação do comprimento telomérico: associação com DECH após o TMO.....	84
6.1.3. Avaliação do comprimento telomérico: associação com a falha de enxertia secundária após o TMO.....	86
6.1.4. Avaliação do comprimento telomérico: associação com a toxicidade relacionada ao TMO	87
6.1.5. Avaliação do comprimento telomérico: associação com a sobrevida global após o TMO	87
6.2. O uso do método <i>qPCR</i> para avaliação do comprimento telomérico	90
7. CONCLUSÕES.....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
9. APÊNDICES	112

1- Introdução

1.1. Telômero

1.1.1 Biologia do telômero

Telômeros são elementos estruturais que selam o final dos cromossomos, protegendo-os de recombinações, fusões ponta a ponta e encurtamento do DNA (ácido desoxirribonucléico (*do inglês deoxyribonucleic acid*) genômico. Nas células somáticas de humanos, os telômeros consistem de mais de mil repetições sequenciais de nucleotídeos (CCCTAA em uma fita do DNA e TTAGGG na outra) e proteínas associadas¹. Essas repetições são gradualmente perdidas com a replicação celular e com a idade, em consequência da inabilidade da enzima DNA polimerase para replicar completamente o final 3' do DNA^{2,3}. O atrito das repetições, eventualmente, encurta o telômero criticamente; o resultado é a parada de proliferação e senescência, redução da expectativa de vida, apoptose ou instabilidade genômica das células⁴.

A manutenção da integridade dos telômeros requer o complexo ribonucleoproteico da telomerase, que consiste na transcriptase reversa da telomerase (TERT), no seu molde de RNA (TERC - telomerase RNA component) e no complexo de proteção composto por proteínas associadas (shelterin)⁵. O TERT copia a região curta TERC dentro do DNA telomérico para estender o final 3' dos cromossomos⁶⁻⁹ (Figura 1).

A região promotora TERT possui receptor de estrógeno e, em tecidos reprodutivos, os hormônios estrogênio e androgênio têm importância na regulação da expressão e atividade da telomerase^{10,12}. Outro mecanismo de regulação da atividade de telomerase é por meio da fosforilação da enzima TERT^{11,12}. Nas células hematopoéticas, moduladores específicos ainda não foram caracterizados. Entretanto, recentemente, um estudo demonstrou a ativação da telomerase por estrógenos e andrógenos mediada por receptores de estrogênio na região promotora TERT das células hematopoéticas¹³.

Figura 1: Estrutura e função do complexo da telomerase. **(A)** TERT adiciona repetições de nucleotídeos TTAGGG na extremidade 3' do telômero usando TERC como modelo. Outras proteínas (discereína, NOP10, NHP2 e GAR) também estão ligadas ao TERC e estabilizam o complexo da telomerase. **(B)** Estrutura linear do TERT, que consiste em região central de transcriptase reversa (1, 2, A, B, C, D e E), uma região N e C terminal. A região N terminal compreende a região N-terminal essencial (TEN), a CO e QFP domínios. A região C terminal contém quatro domínios (E-I a E-IV). **(C)** Estrutura TERC em humanos, que contém sete regiões conservadas (CRs). Também inclui pequeno molde nucleolar H/ACA. A TERC se liga a outras proteínas, como a discereína, NHP2 e NOP10 através da via H/ACA. (Adaptada de Calado; Young, 2008)⁹.

1.1.2 Telomeropatias associadas à falência medular óssea

O reparo inadequado do telômero e o atrito telomérico acelerado podem ser causas moleculares de doenças. As células-tronco hematopoéticas expressam telomerase em resposta à enorme demanda diária por células vermelhas, brancas e plaquetas. Enquanto a

superexpressão da telomerase em outros tecidos pode causar crescimento maligno, o reparo telomérico defeituoso nas células-tronco hematopoéticas pode desencadear doenças graves relacionadas à falência dessas células, como por exemplo, a anemia aplástica grave (AAG) congênita ou adquirida⁹. Defeitos no mecanismo de reparo do telômero têm sido implicados em formas hereditárias de falência medular como a anemia de Fanconi^{14,15}, síndrome Shwachman-Diamond¹⁷ e disceratose congênita, esta é geralmente diagnosticada em pacientes jovens após o desenvolvimento da anemia aplástica (AA) com anormalidades físicas^{9,17,18}. As principais mutações nos genes do complexo da telomerase estão representadas na Figura 2.

Mutações nos genes TERC ou TERT têm sido identificadas em 5-10% dos casos de AA adquirida sem anormalidades físicas associadas^{17,19}. Estudos recentes sugerem que até um terço dos pacientes com AAG apresentam telômero curto²⁰⁻²². Inicialmente, presumia-se que o desenvolvimento de AA era secundário ao “stress” hematopoético. Entretanto, a descoberta de mutações nos genes do complexo da telomerase (TERC, TERT) estabeleceu uma etiologia genética para o atrito telomérico em alguns pacientes com falência medular que não possuíam estigmas associados à síndrome de falência medular hereditária^{1,23}. Em um estudo de coorte, a frequência de mutações dos genes TERT e TERC, nos pacientes com AA adquirida, foi de aproximadamente 4% em ambas as mutações^{1,24-26}. No entanto, o encurtamento telomérico não é determinado somente pelas mutações nos genes do complexo da telomerase: fatores ambientais podem modular a erosão telomérica em humanos. Fisiologicamente, os telômeros tornam-se mais curtos com a idade e iatrogenicamente também podem se tornar mais curtos após quimioterapia intensiva, como no contexto do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas²⁷. Portanto, nos últimos quinze anos, a correlação entre telômero, defeitos genéticos no complexo da telomerase e falência medular tem sido uma área de grande interesse.

Figura 2: Mutações gênicas no complexo da telomerase e doenças humanas associadas. As mutações em verde foram descritas em pacientes com anemia aplástica adquirida, em vermelho se referem a pacientes com disqueratose congênita e as em preto foram encontradas em pacientes com fibrose pulmonar. Os polimorfismos estão representados em azul. Mutações encontradas em mais de uma doença estão representadas em dupla cor. (Adaptada de Calado; Young, 2008)⁹.

1.2 Anemia aplástica

1.2.1 Anemia aplástica: definição e critérios diagnósticos

A introdução do conceito de AA foi realizada por Paul Ehrlich em 1888. O termo “AA” foi introduzido por Vaquez e Aubertin no ano de 1904. A palavra “aplastica” é derivada do grego “a” e “plasso” que significa “sem forma”. O termo “anemia” é potencialmente “enganador”, pois os pacientes com AA apresentam falha na produção das três linhagens hematopoéticas. A combinação de citopenia periférica com redução ou ausência de precursores hematopoéticos na medula óssea (MO) caracteriza a AA²⁸.

A AA é classificada em leve, moderada ou grave. Os desfechos clínicos e o manejo inicial dependem da gravidade da doença²⁹. A citopenia severa pode causar múltiplas

complicações como anemia, hemorragias e infecções com risco de evolução fatal³⁰. A AAG é diagnosticada quando os pacientes apresentam celularidade da MO menor que 30% e pelo menos dois dos seguintes critérios: 1) contagem de neutrófilos menor que $0.5 \times 10^9/L$; 2) contagem de plaquetas menor que $20 \times 10^9/L$; 3) contagem de reticulócitos corrigido menor que 1%³¹.

A taxa de incidência de AA varia de 1,4 a 14 casos por milhão de habitantes^{32,33}, com maior prevalência da doença nos países asiáticos^{34,35}. Um estudo conduzido no Brasil reportou a incidência de 2,4 casos/ano por milhão de habitantes³⁶. A AA adquirida apresenta curva de distribuição bimodal, com pico entre 15 e 25 anos e um segundo pico após 60 anos de idade. Também possui frequência semelhante em ambos os sexos^{37,38}. Embora haja várias etiologias conhecidas, a causa da AA é geralmente difícil de ser determinada em um indivíduo, e na maioria dos casos a etiologia não é encontrada³⁷.

1.2.2 Fisiopatologia da anemia aplástica adquirida

Sugere-se que a fisiopatologia da AA adquirida seja imunomediada e alguns fatores genéticos podem contribuir para o desenvolvimento da doença quando associado a fatores ambientais como dano induzido por produtos químicos, drogas, vírus ou outros antígenos²⁸.

A descoberta de mutações que levam à perda de função dos genes do complexo da telomerase (TERT e TERC) estabeleceu uma etiologia genética para o atrito telomérico na falência medular. Atualmente, mutações da telomerase são consideradas etiologia para a síndrome de falência medular constitucional - diskeratose congênita, Shwachman-Diamond, anemia de Fanconi, sendo também encontradas em uma minoria dos pacientes com AAG⁹. A distinção histórica e clara entre AA adquirida e constitucional não apresenta limites bem definidos, atualmente, devido à descoberta de mutações no complexo de reparo da telomerase em casos de AA sem história familiar aparente e ausência de anormalidades físicas³⁹.

Recentemente, um estudo retrospectivo⁴⁰ (n=183) descreveu a associação entre a variação do comprimento telomérico e os desfechos clínicos em pacientes com AAG, que receberam terapia imunossupressora. O estudo em questão demonstrou aumento do risco

de recaídas, evolução clonal e menor sobrevida global (SG) nos pacientes com comprimento telomérico menor⁴¹.

Dentre os mecanismos fisiopatológicos imunomediados, a expansão oligo ou monoclonal de linfócitos T CD8+ tem sido encontrada em pacientes com AA adquirida. O achado dessa subpopulação de células T suporta a hipótese de que um dos mecanismos da AA é o ataque do linfócito antígeno específico contra as células do tecido hematopoético⁴¹. O T-bet, um fator de transcrição que se liga à região promotora do IFN-gama (Interferon gama), responsável pela polarização da resposta Th1, possui expressão aumentada nas células T de pacientes com AA⁴². Por sua vez, o IFN gama, uma citocina de supressão medular Th1, apresenta sua expressão aumentada em pacientes com AA, com posterior redução após resposta à imunossupressão^{43,44}. Já as células T - regulatórias apresentam déficit funcional e quantitativo⁴⁵. Na linfocitose, as mutações adquiridas na STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) são prevalentes e funcionalmente podem resultar na ativação constitucional⁴⁶.

A presença de autoanticorpos contra células hematopoéticas K562 corrobora a hipótese de associação da AA com fenômenos imunológicos⁴⁷. Phillipot et al.⁴⁸ demonstraram que as células CD34+ são mais apoptóticas do que as de pacientes saudáveis. Outros autores reportaram o aumento da expressão do antígeno Fas (nas células CD34+ de pacientes com AA. Esse antígeno é um receptor de sinal de apoptose celular e está associado ao aumento de expressão de IFN-gama e TNF (*Tumoral Necrosis Factor*) alfa^{44,49,50}. Dentre os outros fatores genéticos, há a trombocitopenia megacariocítica congênita e a AA familiar. Ambas estão associadas a anormalidades do receptor da trombopoetina⁵¹.

1.2.3. Anemia aplástica: terapêutica

Os avanços no Transplante de Medula Óssea (TMO) e na terapia imunossupressora têm melhorado a sobrevida de pacientes com AAG de 10 - 20% na década de 1960 a 80 - 90%, atualmente. O tratamento de escolha para adultos jovens com doador relacionado compatível é o TMO, enquanto a terapia imunossupressora é frequentemente utilizada nos pacientes idosos ou que não possuem doador relacionado compatível^{52,53}.

A terapia imunossupressora padronizada consiste em uso de globulina antilinfocítica (GAL) equina e ciclosporina (CSA). A taxa de resposta hematológica é em torno de 60 - 75% dos casos⁵³. As crianças possuem melhor resposta com GAL de cavalo e CSA⁵⁴⁻⁵⁶. Já os pacientes idosos tendem a ter menores taxas de resposta, em torno de 50%^{57,58}. O fator preditor de sobrevida em longo termo, após a terapia imunossupressora, é a resposta hematológica em menos de seis meses com independência transfusional^{39,52}.

O uso de GAL de cavalo tem sido analisado em grandes estudos clínicos prospectivos^{54,58-61}. Nos últimos quinze anos, a formulação de GAL de coelho ganhou popularidade e, inicialmente, foi utilizada no contexto de refratariedade e recaída, mostrando boa resposta⁵⁹⁻⁶¹. Como a maior linfotoxicidade da GAL de coelho demonstrou ser superior para proteção de enxertos renais, quando comparada com a GAL de cavalo, propôs-se o uso de GAL de coelho como terapia de primeira linha para a AAG. No entanto, um estudo prospectivo randomizado demonstrou que GAL de coelho promove menor taxa de resposta hematológica aos seis meses (37%), quando comparada à GAL de cavalo (68%), além de SG de 70% *versus* 94%, respectivamente⁵⁹.

A adição de outros imunossupressores como micofenolato mofetil ou *sirolimus* e fatores de crescimento não melhorou os desfechos do tratamento padrão com GAL de cavalo^{62,63}. A associação de fator de crescimento de granulócitos (G-CSF) à terapia com GAL de cavalo também não demonstrou diferença na taxa de resposta hematológica, sobrevida livre de eventos ou SG⁶¹. A maioria das respostas ao tratamento imunossupressor ocorre nos primeiros três meses, e somente 5 a 10% das respostas ocorrem entre três e seis meses. A terapia de resgate está indicada nos casos refratários ou com piora clínica e transfusional entre três e seis meses⁵³.

Para os pacientes menores de 40 anos, com doador relacionado HLA (Antígeno leucocitário humano - do inglês: *Human leukocyte antigen*) idêntico, o TMO alogênico deve ser oferecido como terapia de primeira linha⁶⁴. Apesar de o TMO conferir SG em torno de 70 a 100% para os pacientes com AAG, comorbidades relacionadas ao procedimento existem: falha de enxertia primária, infecções, doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e recidiva da doença de base estão entre as principais⁶⁴.

Todos os pacientes sem doador compatível deveriam realizar a busca de potenciais doadores não relacionados nos registros de banco de medula óssea ao iniciar a terapia imunossupressora. Em estudo retrospectivo recente do *Center for International Blood and*

*Marrow Transplant Research (CIBMTR)*⁶⁵, a sobrevida era inversamente correlacionada com a idade do receptor. A taxa de sobrevida aos cinco anos foi de 82% para a faixa etária menor que vinte anos e de aproximadamente 50% para os maiores de quarenta anos.

Para os pacientes que não possuem doador relacionado, a GAL deve ser aplicada como terapia inicial. Para os não respondedores aos seis meses, o TMO não relacionado deve ser considerado; e um novo ciclo de terapia imunossupressora para os pacientes sem doadores não relacionados compatíveis deve ser iniciada. Quando o paciente torna-se refratário a dois ciclos de terapia imunossupressora, considerações sobre a realização de TMO com incompatibilidade HLA, haploidêntico ou doador cordão umbilical (CB) devem ser analisadas individualmente e de preferência realizar essa terapia por meio de estudos clínicos⁶⁶.

1.3 Transplante de medula óssea alogênico para anemia aplástica grave com doador relacionado

1.3.1 Avaliação do tipo de fonte células-tronco hematopoéticas

A MO era o único tipo de fonte de células-tronco hematopoéticas até o início da década de 1970⁶⁷. O uso de células progenitoras hematopoéticas (CPH) do cordão umbilical (CB- *cord blood*) e do sangue periférico (SP) iniciou-se após 1980. A utilização de CPH-SP tornou-se popular por se acreditar que era mais seguro para o doador e que preveniria a recaída. Porém, em um amplo estudo, documentou-se o maior risco de eventos adversos severos no grupo de doadores de células-tronco de fonte periférica (25% *versus* 12% para MO, $p<0,05$)⁶⁸. Adicionalmente, o uso de fonte de células progenitoras periférica aumentava significativamente o risco de DECH⁶⁹ e apresentava menor resposta ao tratamento⁷⁰. Apesar desses dados, o uso de fonte periférica tem sido amplo devido à hipótese de que poderia solucionar o problema de falha de enxertia, principalmente nos pacientes que são sensibilizados após múltiplas transfusões⁷¹. No período de 2001 a 2010, a proporção de pacientes recebendo tipo de fonte periférica foi de 40% para doadores relacionados e 48% para os não relacionados⁷⁴ de acordo com o registro do *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT). Em 2012, esse grupo publicou a análise de transplantes realizados em 1999 a 2009 com MO (n=1163) ou PB (n=723) como fonte de células-tronco⁷². O estudo mostrou que os transplantes com tipo de fonte CPH-SP, quando comparados com os de fonte MO, foram associados a maior risco de DECH aguda

grau II-IV (17% vs 11%, $p<0,001$) e crônica (22% vs 11%, $p<0,001$). Houve desvantagem na sobrevida em pacientes com idade de 1-19 anos (76% vs 90%, $p<0,001$), 20 anos ou mais (64% vs 74%, $p<0,001$), e maior que 50 anos (39% vs 69%, $p<0,01$)⁷². Outro estudo comparou três tipos de fonte de células progenitoras hematopoéticas: MO, CPH-SP e MO mobilizada com G-CSF e demonstrou que a taxa de incidência de DECH aguda e crônica foi maior no grupo CPH-SP. Além disso, não houve vantagens na enxertia e sobrevida com MO mobilizada com G-CSF⁷³. Portanto, a MO deve ser a fonte de escolha para obtenção de células progenitoras hematopoéticas para transplantes relacionados HLA-idêntico em pacientes com AAG. O uso de fonte CPH-SP está associado a pior sobrevida e maior incidência de DECH crônica⁷⁴.

1.3.2 Regime de condicionamento

O regime de condicionamento padronizado segue o protocolo original seguido pela equipe de *Seattle*, com ciclofosfamida (CY) 50 mg/kg/d por quatro dias e globulina antitimócito (ATG)⁶⁷. A SG varia de 65% a 95%, de acordo com a idade do paciente^{67,75}. A incidência de tumores sólidos é baixa⁷⁶ e esse regime de condicionamento está associado à preservação da fertilidade⁷⁷.

Em alguns centros de TMO, o regime de condicionamento com CY 200 mg é considerado de fraca intensidade para os pacientes com AA sensibilizados, refratários à transfusão de plaquetas. Um regime de condicionamento alternativo, baseado em fludarabina (FLU), 30 mg/m²/d por três dias (dias -9, -8 e -7) e CY 50 mg/kg/d por quatro dias (dias -5, -4, -3 e -2) e profilaxia de DECH com CSA e metotrexate, por curto período, é sugerido para esses pacientes com SG de 79%. A incidência de DECH aguda grau II-IV foi de 11% e de DECH crônica extensiva de 25%⁷⁸.

O regime de condicionamento baseado em FLU também tem sido utilizado para pacientes idosos⁷⁹⁻⁸¹. Em estudo retrospectivo⁸², pacientes acima de 30 anos que receberam esse regime obtiveram melhor SG, possivelmente devido à menor incidência de falha de enxertia no grupo que recebeu a droga (0 vs 11%, $p<0,09$). Não houve diferença na incidência de DECH.

A irradiação linfóide total ou corporal total é raramente utilizada nos pacientes transplantados com doadores relacionados HLA idêntico. A alta incidência de malignidade

nos pacientes com AAG expostos à irradiação durante o condicionamento tem desencorajado os centros a adotarem essa opção^{75,83,84}.

Um estudo realizado pelo EBMT⁷² demonstrou vantagem no uso de ATG durante o condicionamento com pacientes transplantados doadores relacionados idênticos. Recentemente, outro estudo realizado no Reino Unido⁸⁵, também relatou benefício com o uso de alemtuzumab durante o condicionamento com menor taxa de DECH crônica em relação ao ATG (11% vs 26%, p=0.031).

1.4 Transplante de medula óssea alogênico doador não relacionado para anemia aplástica grave

1.4.1 Tipo de fonte de células-tronco

Um estudo reportado pelo CIBMTR comparou MO (n=225) e CPH-SP (n=71) em pacientes transplantados para AA com doador não relacionado, compatibilidade HLA 8x8 (A, B, C e DRB1)⁸⁶. A recuperação hematológica foi similar em ambos os grupos, a incidência de DECH aguda grau II-IV foi maior no grupo de CPH-SP do que no de MO (48% vs 31%, p=0.02). Não houve diferença comprovada por estatística na taxa de incidência de DECH crônica (Hazard ratio - HR=1.39, p=0.14). A taxa de mortalidade foi maior no grupo de fonte CPH-SP quando comparada com MO (76% vs 61%, p=0.04)⁸⁶.

1.4.2 Regime de condicionamento

O regime de condicionamento mais utilizado tem sido a combinação de FLU, CY e baixas doses de irradiação corporal total (TBI) 2-3 Gy⁸⁷⁻⁹¹. O uso de TBI em altas doses ocasionou maior taxa de mortalidade em crianças e adultos⁸⁹. Um estudo realizado pelo grupo EBMT⁹² reportou 100 pacientes que receberam regime FLU-CY-ATG (FCA), com ou sem TBI, e a SG em cinco anos foi de 73% para o grupo FCA e 79% para o grupo FCA-TBI. A incidência de DECH aguda grau III-IV foi de 18% para o grupo FCA e 7% para o grupo FCA-TBI, e a falha de enxertia foi de 17% em ambos os grupos⁹⁰. Outro regime de condicionamento utilizado, recentemente publicado por um grupo Britânico, consiste na associação de FLU-CY e Alemtuzumab (FCC)⁸⁵. Esse protocolo não utiliza o TBI e, portanto, é fortemente recomendado para doenças não malignas. Os resultados foram

favoráveis para doadores não relacionados⁸⁵. A dose preconizada de CY a ser associada à FLU para os pacientes com AA não está esclarecida, variações entre 50 e 100 mg/kg têm sido recomendadas⁹¹.

1.5 Transplante de cordão umbilical para anemia aplástica grave

Os resultados de transplante de cordão umbilical para AAG adquirida são limitados a pequenos números de casos. O EBMT reportou o desfecho clínico de 71 pacientes com AAG submetidos a transplante de cordão umbilical⁹². A média de idade ao transplante foi de 13 anos e a maioria dos pacientes (63%) recebeu condicionamento de intensidade reduzida (regime baseado em FLU). O número de células nucleadas foi maior que $3,9 \times 10^7/\text{kg}$. Baseados nesses resultados, estudo prospectivo têm sido desenhado para avaliação dos pacientes submetidos a transplante⁹².

1.6 Transplante haploidêntico doador relacionado para anemia aplástica grave

Assim como o transplante de cordão umbilical, dados sobre o transplante haploidêntico com doador relacionado têm sido restritos a um pequeno número de pacientes. Embora haja resultados satisfatórios em crianças, ainda é considerado experimental em adultos, sendo recomendado somente em centros com experiência no manejo clínico⁹³. Entretanto, recentemente, foram reportadas mudanças no protocolo com resultados mais encorajadores, como o uso de células mesenquimais estromais⁹⁴, a combinação de MO e CPH-SP e altas doses de CY após o transplante⁹⁶.

O estudo que associa duas fontes de células-tronco MO e CPH-SP foi baseado em regime de condicionamento não mieloablativo, FCA associado à terapia de fator de crescimento (G-CSF e mimético da trombopoetina). A profilaxia consistiu em combinação de metotrexate, micofenolato mofetil e CSA. Foi realizada profilaxia antifúngica com micafungina e Imunoglobulina 0,4 g/kg semanalmente. Os resultados foram favoráveis, com SG em cinco anos acima de 80% nos pacientes com idade até 25 anos⁹⁵. A adição de CB + MSC (*Mesenchymal Stem Cell*) a este protocolo não demonstrou benefícios⁹⁴.

Um estudo recente reportou o uso de regime não mieloablativo de intensidade reduzida com CY após o transplante em oito pacientes com AAG refratária. Seis em oito

pacientes obtiveram enxertia. A falha de enxertia foi relacionada à presença de anticorpos anti-HLA do doador, apesar da realização de dessensibilização pré-transplante com plasmaférese e rituximabe⁹⁶.

1.7 Complicações após o transplante de medula óssea alogênico

1.7.1 Falha de enxertia primária e secundária

A avaliação do quimerismo doador/receptor por *variable number of tandem repeat* (VNTR) é recomendada após o transplante para AA na MO e, se possível, em linfócitos T periféricos CD3+. Um estudo do quimerismo doador/receptor por VNTR demonstrou que o quimerismo misto ocorre na maioria dos pacientes transplantados⁹⁷. Outro método de avaliação da enxertia é o cariótipo de medula óssea, realizado por citogenética clássica quando há diferença de sexo entre doador e receptor. Pode-se realizar também a tipagem sanguínea quando houver diferença de tipos sanguíneos entre doador e receptor⁹⁷.

A falha de enxertia primária é caracterizada como contagem de neutrófilos abaixo de 500/uL após o D+28 do TMO⁹⁸. A falha de enxertia secundária, por sua vez, é classificada como recuperação de neutrófilos acima de 500/uL, por três dias consecutivos, antes do D+28, seguida de posterior perda do enxerto⁹⁸. Os pacientes com falha de enxertia secundária ou tardia podem ser classificados em dois grupos: 1) pacientes com recuperação autóloga definida como recuperação da hematopoese do receptor; 2) pacientes com perda do enxerto tardia definida como perda progressiva da hematopoese do doador evoluindo para recidiva da AAG, comprovada por análise sequencial periódica do quimerismo após o transplante por meio das técnicas mencionadas: VNTR, cariótipo de MO ou tipagem sanguínea⁹⁸.

1.7.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e crônica

A DECH é uma complicação imunológica após o transplante alogênico. Conforme definição de Billingham, em 1966, três condições são necessárias: 1) administração de células imunocompetentes; 2) presença de histoincompatibilidade entre doador e receptor; 3) inabilidade do receptor em destruir ou inativar as células infundidas do doador⁹⁹. A DECH pode ser classificada em aguda ou crônica e sua definição tradicional é baseada no

tempo de início dos sintomas após o transplante (menos ou mais de cem dias). Recentemente, foi proposta pelo grupo do *National Institutes of Health (NIH)* a definição de DECH aguda ou crônica baseada em sintomas e sinais de especificidade do que em critérios de tempo de início⁹⁹⁻¹⁰¹. A DECH aguda ocorre em três fases reconhecidas. A primeira é o resultado do regime de condicionamento, conhecida como “tempestade de citocinas”, a segunda é a fase de ativação de células T do doador por citocinas e células apresentadoras de antígeno (APC). A terceira fase é a efetora, em que as células T iniciam o processo de agressão às células de alguns tecidos do receptor⁹⁹⁻¹⁰¹.

A DECH aguda é graduada de acordo com os critérios do consenso de Keystone, em 1994 (grau I-IV) ou, menos comumente, de acordo com os critérios do *CIBMTR* em grau A-D^{103,104}. Pode ainda ser classificada em clássica (presença de eritema máculo-papular, sintomas gastrointestinais ou hepatite), quando ocorre dentro dos 100 dias após o transplante ou persistente, recorrente ou de ocorrência tardia, quando aparece após 100 dias do transplante. Ambas ocorrem sem a presença de diagnóstico de DECH crônica⁹⁹⁻¹⁰¹.

A DECH crônica é adicionalmente desencadeada por distúrbios alo e autoimune e pode ocorrer em múltiplos órgãos do hospedeiro. Há alterações na via de reconstituição imunológica e falha na tolerância imunológica adquirida¹⁰⁰. Sua classificação consiste em clássica, quando há somente as manifestações clínicas dessa categoria, ou síndrome de sobreposição, quando há características de DECH aguda e crônica^{99,102,106,107}. Uma nova classificação de gravidade da DECH crônica é recomendada de acordo com o *score* por órgão acometido (escala de 0 a 3). A classificação global de gravidade em leve, moderada ou severa é caracterizada pela combinação de *scores* dos órgãos acometidos, substituindo a classificação da DECH em forma limitada ou extensiva^{102,108,109}. Vários estudos prospectivos têm estabelecido a classificação global devido à fácil aplicabilidade da escala NIH e distribuição dos *scores* por órgão acometido^{108,110,111}.

1.7.3 Mucosite

A mucosite consiste em um processo inflamatório da mucosa oral. Pode ser induzida por irradiação ou quimioterapia e é caracterizada por danos na mucosa, desde lesões eritematosas até ulcerações extensivas, acometendo a submucosa. No contexto do TMO, a mucosite pode acometer, não somente a cavidade oral mas também o trato

digestivo¹¹². Sua incidência nos regimes de condicionamento mieloablativo tem sido estimada em 75 a 100%, além de ser reportada como uma das principais causas de dor em cavidade oral com comprometimento da qualidade de vida¹¹³. A fisiopatologia da mucosite é descrita em um modelo de cinco fases biológicas por Sonis: 1) iniciação; 2) ativação; 3) amplificação de sinal; 4) ulceração; 5) cicatrização envolvendo o tecido epitelial e conjuntivo da mucosa¹¹⁴. A fase de iniciação é caracterizada por dano ao DNA, induzido por radioterapia e quimioterapia, resultando em injúria ao epitélio basal, submucosa e ao endotélio¹¹⁵. Em resposta à agressão, espécies reativas de oxigênio são geradas, amplificam o dano ao DNA e induzem a apoptose celular, além de ativarem vários fatores de transcrição como o fator nuclear κB ¹¹⁶⁻¹¹⁸, levando à amplificação de sinal e ulceração da mucosa oral. A fase de cicatrização da mucosa oral é caracterizada por proliferação epitelial, geralmente concomitante à recuperação hematológica e ao restabelecimento da flora microbiana local¹¹⁹.

1.7.4 Síndrome de obstrução sinusoidal

A síndrome de obstrução sinusoidal (SOS) é caracterizada por obstrução de vênulas hepáticas terminais. Trata-se de uma complicação decorrente de toxicidade hepática induzida por regime de condicionamento mieloablativo (CY combinada com TBI ou Bussulfan - BU) em pacientes submetidos a TMO^{121,122}. A doença pode ocorrer em até 80% dos pacientes que realizaram TMO para doença maligna, variando de leve intensidade à falência hepática. A incidência de SOS é muito menor em pacientes que realizaram TMO para AA idiopática, com taxa de incidência de aproximadamente 7%, mas com alta taxa de mortalidade, aproximadamente 21%¹²². As manifestações clínicas são: hepatomegalia, ascite e hiperbilirrubinemia¹²¹⁻¹²⁴. A fisiopatogenia da SOS compreende, inicialmente: dano às células endoteliais sinusoidais hepáticas, após três a cinco dias, necrose centrilobular e hemorragia das vênulas hepáticas terminais, com evidências estruturais de destruição sinusoidal¹²⁰⁻¹²². Os mecanismos envolvidos na patogênese da SOS são: depleção da glutathione e óxido nítrico, aumento da expressão de metaloproteinases e de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) e ativação de fatores de coagulação¹²⁴.

2. Hipótese e Justificativa do Estudo

A AA é caracterizada por falência da MO, com pancitopenia e hipoplasia da MO de etiologia multifatorial. A patogênese da AA é complexa e envolve alterações do microambiente das células hematopoéticas, deficiência das células-tronco hematopoéticas e desordens imunomediadas²⁸.

A falência medular hereditária é causada por defeitos na biologia do telômero (por exemplo, disceratose congênita), na função ribossomal (por exemplo, anemia de Blackfan-Diamond) ou no reparo do DNA (por exemplo, anemia de Fanconi)^{9,14-16}. Os telômeros consistem em sequências repetidas de nucleotídeos (TTAGG) e suas proteínas associadas nas extremidades dos cromossomos. Tornam-se curtos com a replicação celular e o atrito telomérico desempenha papel fundamental na senescência celular¹⁹. Mutações nos genes TERC ou TERT têm sido identificadas em 5 - 10% dos casos de AA adquirida, sem anormalidades físicas associadas (^{17,19}). Estudos recentes sugerem que até um terço dos pacientes com AAG apresentam telômero curto (^{20,22}). A melhor taxa de sobrevida na AAG nas últimas quatro décadas deve-se a avanços no tratamento por meio de TMO, terapia imunossupressora, imunobiológicos e cuidados de suporte^{29,30}.

O TMO alogênico de doador relacionado HLA-idêntico é recomendado para pacientes jovens com diagnóstico de AAG, enquanto a terapia imunossupressora é frequentemente utilizada para idosos ou para jovens sem doador relacionado compatível⁶⁴. A resposta ao TMO depende da ocorrência ou não de complicações relacionadas ao tratamento como: falha de enxertia, DECH, retardo da reconstituição imune com aumento para risco de complicações infecciosas¹²⁶.

A estimativa da taxa de SG ou da taxa de mortalidade relacionada ao transplante (TRM) é importante na avaliação de risco e benefício do TMO. Os fatores de risco avaliados, atualmente, são: idade do receptor e doador e comorbidades do paciente pré-transplante^{126,127}. Alguns exames séricos, como a ferritina e a proteína C reativa, têm sido avaliados como possíveis indicadores de risco de morbi-mortalidade após o transplante^{128,129}.

Como descrito previamente, o comprimento telomérico é um marcador de senescência e capacidade replicativa das células. Dessa forma, o estudo do comprimento telomérico é oportuno no ambiente de alta proliferação celular como o transplante. Vários estudos demonstraram o encurtamento telomérico após o TMO, quando comparado com o comprimento telomérico de doadores compatíveis¹³⁰⁻¹³³. O telômero curto também foi

associado com doadores idosos, do sexo feminino, e com a ocorrência de DECH crônico no TMO alogênico¹³⁰.

Scheinberg et al.⁴⁰ demonstraram associação entre menor comprimento telomérico e recaída da doença, transformação maligna e diminuição da sobrevida em pacientes com AAG tratados com terapia imunossupressora (gamaglobulina antilinfocitária e CY). Em 2012, Peffault de Latour et al.³⁴ reportaram a importância do telômero do paciente como biomarcador de mortalidade relacionada ao transplante alogênico de MO. Recentemente, Gadalla et al.¹³⁵ relataram a associação do telômero longo do doador com a maior SG em pacientes que realizaram TMO alogênico não relacionado para AAG.

Portanto, neste estudo, avaliou-se a associação do comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico de doadores e receptores de MO com os desfechos clínicos em pacientes transplantados para AAG. A hipótese foi avaliar a associação do comprimento telomérico, como um marcador biológico, para os eventos clínicos enxertia de neutrófilos e plaquetas, DECH aguda e crônica, falha de enxertia tardia, toxicidade relacionada ao transplante como mucosite e SOS e SG.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Associar o comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico de doadores e receptores de TMO para AAG com os desfechos clínicos após o transplante.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar as características clínicas e laboratoriais dos doadores e receptores de TMO e a evolução clínica dos pacientes transplantados para AAG na Unidade de TMO do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR).
2. Avaliar a associação do comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico de doadores e receptores de TMO para AAG com:
 - a. tempo para enxertia de neutrófilos e plaquetas;
 - b. risco de DECH aguda e crônica;
 - c. risco de falha de enxertia tardia;
 - d. risco de toxicidade relacionada ao transplante como mucosite e SOS;
 - e. taxa de SG.

4. Casuística e Métodos

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo de coorte, para análise da associação do comprimento telomérico de leucócitos do sangue periférico pré-TMO alogênico para AAG com os desfechos clínicos. O estudo incluiu transplantes realizados na Unidade de TMO do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (HCFMRP-USP), no período de agosto de 1992 a fevereiro de 2012, e na Unidade de TMO do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade do Paraná (HC-UFPR), no período julho de 1994 a maio de 2014. O seguimento clínico dos transplantes foi realizado até março de 2015. Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Hematologia e na Unidade de TMO do HCFMRP-USP em colaboração com o Laboratório de Imunogenética e a Unidade de TMO do HC-UFPR.

4.2 Pacientes e critérios de elegibilidade

Os pacientes foram considerados elegíveis para o estudo se receberam o primeiro TMO para AAG no período de agosto de 1992 a fevereiro de 2012 para a Unidade de TMO do HCFMRP-USP, ou no período de julho de 1994 a maio de 2014 para a Unidade de TMO do HC-UFPR; com doadores relacionados ou não relacionados e se possuíam amostras criopreservadas avaliáveis de DNA dos leucócitos do sangue periférico pré-transplante de ambos (receptor e doador).

A Unidade de TMO do HCFMRP-USP realizou 64 transplantes no período determinado pelo estudo, sendo disponibilizados 32 transplantes, de acordo com os critérios de elegibilidade (32 amostras de DNA de ambos, receptor e doador). Vinte e quatro pacientes foram excluídos, por não possuírem amostras de DNA dos leucócitos do sangue periférico pré-transplante de ambos (doador e/ou receptor), seis por não apresentarem amostras de DNA de boa qualidade e dois, por falha na avaliação do comprimento telomérico.

A Unidade de TMO do HC-UFPR realizou 347 transplantes no período determinado para o estudo, sendo disponibilizados 34 transplantes, de acordo com os critérios de elegibilidade (34 amostras de DNA de ambos, receptor e doador). Foram excluídos 279 pacientes por não possuírem amostras de DNA dos leucócitos do sangue

periférico pré-transplante de ambos (doador e/ou receptor) e trinta e quatro foram excluídos por não apresentarem amostras de DNA de boa qualidade. Portanto, este estudo incluiu 66 pacientes dos dois centros de TMO.

Figura 3: Critérios de elegibilidade para inclusão no estudo. No fluxograma à esquerda estão representados os transplantes de medula óssea (TMO) realizados no HCFMRP-USP. À direita estão representados os transplantes de medula óssea realizados no HC-UFPR.

O presente estudo, inscrito sob o número CAAE 31332814.7.0000.5440, foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e do HC-UFPR. Os pacientes e doadores, que concordaram em participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Definições do estudo, variáveis e desfechos clínicos analisados

Os desfechos clínicos avaliados foram: SG, falha de enxertia, DECH aguda e crônica e toxicidade relacionada ao transplante. A recuperação de neutrófilos foi definida no primeiro dia de três dias consecutivos, com contagem $\geq 0,5 \times 10^9/L$. A recuperação de plaquetas foi considerada no primeiro de sete dias consecutivos sem transfusão e contagem

de plaquetas $\geq 20 \times 10^9/L$. O regime de condicionamento foi classificado como mieloablativo ou não mieloablativo⁶⁴. Nos pacientes transplantados, a falha de enxertia primária foi caracterizada como contagem de neutrófilos abaixo de 500/uL após o D+28⁹⁸. A falha de enxertia secundária, por sua vez, foi classificada como recuperação de neutrófilos acima de 500/uL por três dias consecutivos antes do D+28, seguido de posterior perda do enxerto⁹⁸. Os pacientes com falha de enxertia secundária foram ainda divididos em dois grupos: 1) pacientes com recuperação autóloga (definida como recuperação da hematopoese do receptor avaliada por análise de quimerismo por meio da técnica de PCR “VNTR”; ou por meio da avaliação do cariótipo de MO, realizado por citogenética clássica quando havia diferença de sexo entre doador e receptor; ou ainda, por meio da tipagem sanguínea quando se observava diferença de tipos sanguíneos entre doador e receptor⁹⁷; 2) pacientes com falha de enxertia tardia, definida como perda progressiva da hematopoese do doador evoluindo para recidiva da AAG, comprovada por análise sequencial periódica do quimerismo após o transplante por meio das técnicas mencionadas: VNTR, cariótipo de MO ou tipagem sanguínea⁹⁷.

A toxicidade relacionada ao transplante foi definida como: morbidade e/ou mortalidade relacionada a efeitos tóxicos da quimioterapia, infecções, mucosite e SOS e hemorragias¹²⁶. Os pacientes, que apresentaram DECH aguda e crônica, foram diagnosticados e classificados segundo os critérios padronizados^{100,101}.

4.4 Avaliação do comprimento telomérico

O comprimento telomérico de leucócitos do sangue periférico pré-transplante dos doadores e receptores foi avaliado por meio de reação em cadeia da polimerase quantitativa (*qPCR*), como descrito previamente por Cawthon, 2002¹³⁵.

As técnicas de extração de DNA variaram intra e intercentro transplantador. Na unidade de TMO do HCRP foram empregados métodos de extração por períodos diferentes: 1) *FluxiGene DNA Kit*, QIAGEN, 2) *Super QUIK - GENE*, 3) *Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, 4) *QIAmp® DNA Mini Kit*. As amostras de DNA extraídas dos leucócitos do sangue periférico estavam previamente armazenadas em freezer a -80°C. Para a realização do *qPCR*, as amostras foram quantificadas, diluídas para 50 ng/uL e

aplicadas em gel de agarose a 1% (após diluição de 3 uL de DNA (150 ng), 2 uL de *load dye* e 5 uL de água) para análise de qualidade do DNA (Figura 4) (Apêndice A).

Os testes de PCR (reação em cadeia da polimerase) foram realizados em um aparelho 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia), em triplicata, e as reações incluíram DNA (1,6 ng), 2x *Rotor - Gene SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen, Hilden, Germany), *RNase free water* (Qiagen), *primer Tel Forward* (300 nM) e *Tel Reverse* (300 nM) ou *primer single gene forward* (36B4 F- 300 nM) e *primer single gene reverse* (36B4 R -500 nM), em reação final de 24 uL. O *qPCR* foi realizado pelo pipetor automatizado QIAgility (Qiagen, Califórnia, USA) e aplicadas no *Rotor- Gene Q* (Qiagen) *real time PCR cyclers* como a seguir: 5 min a 95°C, 25 ciclos (reação do telômero) e 35 ciclos (reação do single gene) a 7 segundos a 98°C e 10 segundos a 60°C (reação do telômero) ou 10 segundos a 58°C (reação do single gene). O comprimento telomérico de cada amostra (x) baseou-se na razão entre o telômero e um gene de cópia única (razão T/S) e foi calculado segundo a fórmula $\Delta C_t [C_t^{(\text{telômeros})} / C_t^{(\text{gene de cópia única})}]$. O comprimento telomérico foi expresso como a razão T/S relativa, normalizada para a média da razão T/S da amostra de referência $[2^{-(\Delta C_{tx} - \Delta C_{tr})} = 2^{-\Delta \Delta C_t}]$, usada para a curva padrão, como amostra de referência e de validação. Para que os resultados de diferentes amplificações pudessem ser comparáveis, o resultado de cada amplificação foi aceito somente se a razão T/S relativa da amostra de referência de validação estivesse com variação do intervalo de confiança (IC) entre 0,95-1,05^{41,137}.

Figura 4: Amostras de DNA em grupos de receptor e doador de MO em gel de agarose 1% da Unidade de TMO HCFMRP-USP e HC-UFPR. As amostras de DNA estão apresentadas em grupos de receptor e doador de 1 a 40. Os retângulos representam amostras DNA de receptor e doador de MO para anemia aplástica grave. Os círculos indicam os pares de DNA receptor e doador de MO para anemia aplástica grave, com boa qualidade para a realização do *qPCR*. (A) As amostras de DNA enumeradas de 1 a 20 são da Unidade de TMO HCFMRP-USP. (B) As amostras de DNA enumeradas de 21 a 40 são da Unidade de TMO do HC-UFPR.

4.5 Análise estatística

O comprimento telomérico dos receptores e doadores de MO foi ajustado para idade de acordo com a taxa de atrito telomérico esperado para a idade do doador. Como a distribuição do comprimento telomérico é linear entre 10 e 60 anos no grupo de doadores saudáveis de um banco controle, determinaram-se as curvas de regressão linear da distribuição do comprimento telomérico de acordo com a idade dos doadores saudáveis e doadores de MO (Figura 5).

Figura 5: Representação da curva de regressão linear do comprimento telomérico de acordo com a idade. Os doadores saudáveis de banco controle estão representados em verde e os de medula óssea em vermelho.

Como as equações, obtidas por meio de regressão linear da distribuição do comprimento telomérico para idade, do banco controle e doadores de MO, são paralelas entre si, optou-se pelo cálculo do comprimento telomérico ajustado para idade de acordo com o comprimento telomérico esperado para idade dos doadores de MO. Dessa forma, por meio da fórmula de regressão linear dos valores T/S doadores: $Y = 1,55059 - (0,01176 \times \text{Idade})$, foram obtidos os valores de T/S esperado para a idade. O cálculo do T/S ajustado para idade é baseado na diferença entre o T/S observado e o T/S esperado para a idade.

Na Figura 6 observa-se que houve diferença nos valores T/S ajustado dos doadores e receptores por centro transplantador.

Figura 6: Distribuição dos valores T/S ajustado para a idade de doadores e receptores de MO por centro transplantador. (A) T/S ajustado dos receptores de MO e (B) T/S ajustado dos doadores de MO. Os doadores e receptores de MO do centro de Ribeirão Preto estão representados em cinza e os do centro de Curitiba em rosa.

Assim, para a confirmação da diferença dos valores de T/S ajustado para idade do receptor e doador entre os centros foi aplicado o Teste de Mann-Whitney com valores de $p < 0,01$ (Figura 7).

Figura 7: Representação *box plot* da valores T/S entre receptores e doadores de MO dos centros Ribeirão Preto e Curitiba. Os valores de T/S ajustado para idade de receptores e doadores do centro de Ribeirão Preto foram menores do que os do centro de Curitiba (valor de $p < 0,01$ teste de Mann-Whitney).

Dessa forma, foi realizada a padronização das diferenças entre os centros transplantadores por meio da fórmula: T/S padronizado observado = (T/S observado - média) (T/S observado do centro) / desvio-padrão (T/S observado do centro). A padronização dos valores T/S do banco controle de doadores saudáveis e a regressão linear dos valores T/S foram realizadas para o cálculo do T/S esperado para idade por meio da fórmula $Y = 0,8447 - (0,02887 \times \text{Idade})$ (Figura 8). Posteriormente, os valores T/S padronizado ajustado (Z) dos receptores e doadores foram obtidos por meio da fórmula: $Z = \text{T/S padronizado observado} - \text{T/S padronizado esperado para idade}$ (ou $Z = \text{T/S observado} - Y$).

Figura 8: Representação da curva de regressão linear dos valores T/S padronizado banco controle, de acordo com a idade. Os doadores saudáveis do banco controle estão representados em vermelho e os de MO em verde.

Os valores de T/S padronizado ajustado do receptor e doador foram categorizados em tertis para posterior análise das variáveis clínicas pré-TMO e dos desfechos clínicos após o TMO. Para os valores de T/S do receptor no primeiro tertil (T1) menores que -0,581 foram denominados telômero curto, no segundo tertil (T2) entre -0,581 a 0,169, telômero

intermediário, e no terceiro tertil (T3) maior que 0,169, telômero longo. Para os valores de T/S do doador no primeiro tertil (T1) menores que -0,644 foram denominados telômero curto, no segundo tertil (T2) entre -0,644 a 0,292, telômero intermediário e no terceiro tertil (T3) maior que 0,292, telômero longo.

Média e proporções, estratificadas por tertis teloméricos, ajustados para idade de receptores e doadores, foram usadas para descrever idade ao TMO, em anos, sexo, compatibilidade de grupo sanguíneo (ABO) do doador e receptor, tempo entre diagnóstico e TMO, em meses, tipo de doador e compatibilidade de HLA, fonte de células-tronco hematopoéticas, regime de condicionamento, número de transfusões antes do transplante, enxertia de neutrófilos e plaquetas, profilaxia de DECH e ano do TMO.

Com base no modelo de regressão de riscos proporcionais de *Cox*, foi estimado o HR entre os grupos T/S padronizado ajustado receptor T1 vs T2 e T3 vs T2, para os eventos clínicos SG e falha de enxertia tardia. Pacientes no segundo e terceiro tertis - grupo T2 vs T3 (HR = 1,98; IC = 0,18 - 21,88 e $p=0,58$) foram combinados devido ao HR ser menor quando comparado com o primeiro e segundo tertis - grupo T1 vs T2 (HR = 3,25; IC = 0,34 - 31,30 e $p=0,31$).

Com base na curva roc dos valores T/S padronizado ajustado dos receptores e doadores para os eventos clínicos DECH aguda, falha de enxertia tardia e SG, estimou-se o valor do T/S, que muda o desfecho para o evento clínico, (Apêndice B). Para o evento DECH aguda, no grupo T/S receptor, a análise pelo método curva roc permitiu agrupar o primeiro e segundo tertis (área sobre a curva = 0,65; IC = 0,52 a 0,77; valor T/S $<0,0213$; sensibilidade 100% e especificidade 55%). Para o evento falha de enxertia, no grupo T/S doador, a análise pelo método curva roc também permitiu agrupar o primeiro e segundo tertis (área sobre a curva = 0,641; IC = 0,51 a 0,75; valor T/S $<0,0275$; sensibilidade 88,89% e especificidade 42,11%). Ainda para o evento DECH aguda, no grupo T/S doador, a análise pelo método curva roc permitiu agrupar o segundo e o terceiro tertis (área sobre a curva = 0,64; IC = 0,51 a 0,75; valor T/S $<-0,8016$; sensibilidade 57,14% e especificidade 76,24%). Para os eventos falha de enxertia no grupo receptor e SG, no grupo receptor e doador T/S, não foi possível estimar o valor T/S pela análise da curva roc. Dessa forma, optou-se pela análise da associação dos grupos T/S dos receptores e doadores: T1 vs T2 + T3 e dos grupos T1+T2 vs T3 com os eventos clínicos após o transplante.

Para verificar a associação entre as variáveis de interesse TMO e a classificação (tertil) dos valores T/S, foi utilizado o teste exato de Fisher, realizado com o auxílio do *software* SAS® 9.2, por meio da PROC FREQ. Os valores de P bicaudal foram usados inteiramente e considerados estatisticamente significativos, se menores que 0,05.

Para quantificar a associação de risco entre a classificação dos valores T/S do receptor e doador (T1 vs T2+T3 e T1+T2 vs T3) e os eventos clínicos enxertia de neutrófilos e plaquetas, DECH aguda e crônica, falha de enxertia tardia, perda do enxerto tardia e recuperação autóloga, foi aplicado o modelo de regressão de riscos competitivos, proposto por Fine e Gray¹³⁷. Esse modelo é apropriado para produzir curvas de incidência acumulada para os grupos de interesse.

O teste de *Log-rank*, pelo método de Kaplan-Meier, foi aplicado para o cálculo de probabilidade de SG entre a classificação do T/S (T1 versus T2+T3) em um ano do TMO, com IC de 95%. O teste foi realizado com o auxílio do *software* SAS® 9.2, por meio da PROC LIFETEST. Além disso, foi realizada, para a análise de SG, a regressão de riscos proporcionais de *Cox* para estimar o *HR* ajustado para idade do receptor e doador e número de transfusões. Esse teste também foi aplicado para o cálculo de risco para o evento DECH aguda, em relação à variável T/S do receptor grupo T1+T2 vs T3. Devido a ausência de eventos no grupo T3 não foi possível aplicar o modelo de regressão de riscos competitivos. Para quantificar a associação de risco entre a classificação dos valores T/S (T1 vs T2+T3 e T1+T2 vs T3) e as variáveis de interesse mucosite por meio de *odds ratio* (OR), foi proposto um modelo de regressão logística múltiplo, que permite associar variáveis independentes com uma variável resposta, sendo esta do tipo binária¹³⁸.

5. Resultados

5.1 Resultados clínicos

As variáveis clínicas dos pacientes transplantados na Unidade de TMO do HCFMRP-USP e do HC-UFPR encontram-se descritos na Tabela 1. Foram avaliados 32 pacientes na Unidade de TMO do HCFMRP-USP e 34 na Unidade de TMO do HC-UFPR. Houve maior prevalência do sexo masculino em ambos os centros, a mediana de idade do receptor, em anos, ao transplante foi de 23 e 19 anos na Unidade de TMO HCRP e HCPR, respectivamente e a faixa etária do receptor de maior prevalência ao TMO foi de 11 a 40 anos em ambos os centros. A mediana de idade do doador, em anos, ao transplante foi de 27 e 22 anos na Unidade de TMO HCRP e HCPR, respectivamente, e a faixa etária do doador de maior prevalência ao TMO foi de 11 a 40 anos em ambos os centros. A relação do sexo do doador/receptor apresentou prevalência variável em ambos os centros. O tempo entre diagnóstico e transplante menor que seis meses, tipagem sanguínea ABO isogrupos, doador relacionado com compatibilidade de HLA 6 x 6 e fonte de células-tronco da MO foram de maior prevalência em ambos os centros. O regime de condicionamento mais utilizado foi o não mieloablativo CY ou CY + ATG na Unidade de TMO do HCRP e mieloablativo BU (12) + CY na Unidade de TMO do HCPR. A opção pelo regime mieloablativo na Unidade de TMO do HCPR deveu-se à não disponibilidade de uso de ATG para os pacientes alossensibilizados HLA após politransfusões. No HCRP, três pacientes realizaram o regime de condicionamento mieloablativo FLUBU¹¹ devido à presença do clone HPN. O número de pacientes com mais de 15 transfusões antes do transplante foi 19 (60%) e 23 (68%) nos respectivos centros de TMO. A mediana, em dias, de enxertia de neutrófilos e plaquetas foi de 17 e 20 dias no HCRP; e no HCPR, de 20 e 20 dias, respectivamente. A profilaxia para DECH com CSA e metotrexate foi a mais utilizada em ambos os centros. O tempo de seguimento dos pacientes após o transplante variou de 3 a 22 anos para o centro de TMO do HCRP e de 10 meses a 18 anos para o centro de TMO do HCPR.

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes transplantados para anemia aplástica grave no HCRP e HCPR.

Unidade de TMO	HCRP	HCPR	Ambos
Total	32 (100%)	34 (100%)	66 (100%)
Sexo			
Masculino	23 (72%)	21 (62%)	44 (66%)
Feminino	9 (28%)	13 (38%)	22 (34%)
M/F	2,5:1	1,6:1	2:1
Mediana de Idade em anos do paciente ao Transplante	23 (3 a 46)	19 (1 a 47)	20 (1-47)
Mediana de Idade em anos do doador ao Transplante	27 (4 a 52)	22 (4 a 50)	23 (4-52)
Número de pacientes por categoria de idade			
1 a 10 anos	3 (9%)	6 (18%)	9 (14%)
11 a 20 anos	8 (25%)	15 (44%)	23 (35%)
21 a 40 anos	17 (53%)	9 (26%)	26 (39%)
> 40 anos	4 (13%)	4 (12%)	8 (12%)
Número de doadores por categoria de idade			
1 a 10 anos	3 (9%)	7 (21%)	10 (15%)
11 a 20 anos	6 (19%)	6 (18%)	12 (18%)
21 a 40 anos	18 (57%)	17 (50%)	35 (53%)
> 40 anos	5 (15%)	4 (11%)	9 (14%)
Sexo doador/receptor			
M/M	14 (44%)	9 (26%)	23 (35%)
F/F	6 (19%)	7 (21%)	13 (20%)
M/F	3 (9%)	6 (18%)	9 (13%)
F/M	9 (28%)	12 (35%)	21 (32%)
Tempo entre diagnóstico e TMO (meses)			
<2	19 (60%)	13 (38%)	32 (48%)
2-6	5 (15%)	13 (38%)	18 (27%)
7-12	4 (13%)	3 (9%)	7 (10%)
>13	4 (13%)	5 (15%)	9 (14%)
Grupo ABO			
Isogrupo	20 (63%)	24 (71%)	44 (67%)
Incompatibilidade menor	-	3 (9%)	3 (5%)
Incompatibilidade maior	9 (28%)	6 (17%)	15 (22%)
Incompatibilidade bidirecional	3 (9%)	1 (3%)	4 (6%)
Tipo doador e compatibilidade HLA			
Relacionado 6x6	29 (91%)	31 (91%)	60 (91%)
Relacionado haploidêmico mãe	-	2 (6%)	2 (3%)
Não relacionado 10x10	3 (9%)	-	3 (5%)
Não relacionado 9x10	-	1 (3%)	1 (1%)

continua

Fonte de células tronco			
Medula Óssea	29 (91%)	34(100%)	63 (95%)
CPH-SP	3 (9%)	-	3 (4%)
Número de células infundidas em receptores de MO			
1 a 1.9 x 10 ⁸ células mononucleares/kg	1 (3%)	3 (8%)	4 (6%)
2 a 2.9 x 10 ⁸ células mononucleares/kg	6 (19%)	11(32%)	17 (26%)
>3 x 10 ⁸ células mononucleares/kg	23 (72%)	20(59%)	43 (67%)
1 a 2 x 10 ⁶ CD34+/kg	2 (6%)	-	2 (3%)
2 a 4 x 10 ⁶ CD34+/kg	1 (3%)	-	1 (1%)
>4 x 10 ⁶ CD34+/kg	-	-	-
Regime de condicionamento			
CY	14 (44%)	11 (32%)	25 (38%)
CY + ATG	12 (37%)	-	12 (19%)
FLUBU (12) + ATG	2 (6%)	-	2 (3%)
FLUBU (12)	1 (3%)	-	1 (2%)
FLUBU (8)	-	3 (9%)	3 (4%)
FLU + CY + TBI	-	2 (6%)	2 (3%)
FLU + CY + TBI + ATG	3 (10%)	-	3 (4%)
BU (12) + CY	-	18 (53%)	18 (27%)
Números de transfusões antes do transplante			
<15 transfusões	13 (40%)	11 (32%)	24 (36%)
>15 transfusões	19 (60%)	23 (68%)	42 (64%)
Mediana de enxertia de neutrófilos em dias			
	17(12-25)	20(13-34)	18(12-34)
Mediana de enxertia de plaquetas em dias			
	20(11-41)	20 (9-41)	20 (9-41)
Profilaxia GvHD			
CSA + MTX	30 (94%)	32 (94%)	62 (94%)
CSA + MMF	2 (6%)	-	2 (3%)
CSA + MMF + CY	-	2(6%)	2 (3%)
Ano TMO			
1992 – 2000	6 (19%)	5 (15%)	11 (17%)
2001 – 2009	14 (44%)	10 (29%)	24 (36%)
2010 – 2014	13 (40%)	19 (56%)	32 (48%)

CY: Ciclofosfamida IV 200mg/kg; **CY+ATG:** Ciclofosfamida IV 200mg/kg + globulina antitimócito IV 4,5mg/kg; **FLUBU(12):** Fludarabina IV 150mg/m² e Bussulfan VO 12mg/kg; **FLUBU(12)+ATG:** Fludarabina IV 150mg/m², Bussulfan VO 12mg/kg e globulina anti-timócito IV 4,5mg/kg; **FLUBU(8):** Fludarabina IV 150mg/m² e Bussulfan VO 8mg/kg; **FLU+CY+TBI:** Fludarabina IV 150mg/m², CY IV 29mg/kg e Irradiação corporal total 2Gy; **FLU+CY+TBI+ATG:** Fludarabina IV 150mg/m², CY IV 120mg/kg e Irradiação corporal total 2Gy e globulina anti-timócito IV 4,5mg/kg; **BU(12)+CY:** Bussulfan VO 12mg/kg e Ciclofosfamida IV 120mg/kg; **DECH:** doença do enxerto contra o hospedeiro; **CSA:** ciclosporina IV 3mg/kg; **MTX:** Metotrexate IV 15mg/m² D+1 e 10mg/m² D+3, D+6, D+11; **MMF:** Micofenolato mofetil; **CY:** Ciclofosfamida IV 50mg/kg D+3 e D+4; **TMO:** Transplante de Medula Óssea; **HCRP:** Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto; **HCPR:** Hospital de Clínicas do Paraná; **M:** masculino; **F:** feminino; **HLA:** Antígeno Leucocitário Humano; **CPH-SP:** Células Progenitoras Hematopoéticas; **MO:** Medula Óssea; **CD34+:** glicoproteína transmembrana expressa em células progenitoras hematopoéticas.

A frequência de falência primária foi zero na Unidade de TMO do HCRP e de um caso na Unidade de TMO do HCPR. A frequência de falha de enxertia secundária foi de cinco casos (n=32) na Unidade de TMO do HCRP e cinco casos (n=34) na Unidade de TMO do HCPR, totalizando dez casos (n=66) de falência de enxertia tardia. No grupo de falência de enxertia secundária, a recuperação autóloga ocorreu em quatro pacientes transplantados e a perda de enxertia tardia em seis (n=66) (Tabela 2). Na Unidade de TMO do HCRP o número de pacientes com DECH aguda grau I foi seis (n=32), grau II, um (n=32) e não houve pacientes com DECH aguda grau III-IV. Oito de 32 pacientes apresentaram DECH crônica. No HCPR, apenas um paciente apresentou DECH aguda grau II e cinco pacientes apresentaram DECH crônica (n=34) (Tabela 2).

Tabela 2: Desfechos clínicos após TMO alogênico em pacientes com anemia aplástica no HCRP e HCPR.

	HCRP	HCPR	Ambos
Total	32	34	66
Sobrevida global	27 (85%)	33 (97%)	60 (90%)
TRM	5 (15%)	1 (3%)	6 (9%)
Infecções	5 (15%)	1 (3%)	6 (9%)
Hemorragias	-	-	-
DECH	-	-	-
Falha de enxertia	-	-	-
DECH aguda			
Grau I	5 (15%)	-	5 (7,5%)
Grau II	1 (3%)	1(3%)	2 (3%)
Grau III-IV	-	-	-
DECH crônica (%)	8 (25%)	5 (15%)	13 (20%)
Clássica	7 (22%)	4 (12%)	11 (17%)
Sd de sobreposição	1(3%)	1(3%)	2 (3%)
Falha de enxertia	5 (15%)	6 (18%)	11 (16,5%)
RA	2 (6%)	2 (6%)	4 (6%)
PE	3 (9%)	3 (9%)	6 (9%)
Primária	-	1 (3%)	1 (1,5%)
Toxicidade			
Infecções	28 (87%)	21 (62%)	49 (74%)
Hemorragias	2(6%)	1 (3%)	3 (4%)
SOS	4 (12%)	0	4 (6%)
Mucosite	7 (22%)	28 (82%)	35 (53%)
Cistite hemorrágica	4 (12%)	2 (6%)	6 (9%)

HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto; **HCPR:** Hospital das Clínicas do Paraná; **DECH:** doença do enxerto contra hospedeiro; **RA:** recuperação autóloga; **PE:** perda de enxertia tardia; **SOS:** síndrome obstrutiva sinusoidal.

5.2 Comprimento telomérico em receptores e doadores pré-TMO

O comprimento telomérico foi avaliado em leucócitos do PB pré-transplante de 66 receptores e doadores de MO. O comprimento telomérico padronizado dos receptores foi menor do que os dos doadores ao ser analisado por faixa etária, exceto na faixa etária de 21 a 40 anos, que foi semelhante (Figura 9).

Figura 9: Representação *box plot* da distribuição do comprimento telomérico por faixa etária entre doadores e receptores. O comprimento telomérico foi menor nos receptores, em relação aos doadores, em todas as faixas etárias, exceto entre 21 - 40 anos, que foi semelhante.

5.2.1 Comprimento telomérico do receptor e variáveis clínicas pré-TMO

As características clínicas dos pacientes transplantados para AAG estão descritas por tertis do comprimento telomérico do receptor ajustado para idade (Tabela 3).

Tabela 3: Características clínicas dos pacientes transplantados para anemia aplástica por tertis de comprimento telomérico do receptor ajustado para idade.

<i>Características</i>	Todos	T1 < -0,581	Tertis -0,581 < T2 < 0,169	T3 > 0,169
<i>Média do comprimento telomérico padronizado do receptor (variação)</i>	-0,004 (-2,175 a 3,120)	-0,906 (-2,175 a -0,126)	-0,152 (-0,875 a 0,453)	1,058 (0,129 a 3,120)
<i>Média do comprimento telomérico padronizado do receptor ajustado para idade (variação)</i>	-0,178 (-2,644 a 3,593)	-1,203 (-2,644 a -0,585)	-0,169 (-0,572 a 0,149)	0,838 (0,1793 a 2,593)
<i>Número de doadores</i>	66 (100%)	22 (33,3%)	22 (33,3%)	22 (33,3%)
<i>Sexo do receptor</i>				
Masculino	44 (66,7%)	17 (77,3%)	17 (77,3%)	10 (45,5%)
Feminino	22 (33,3%)	5 (22,7%)	5 (22,7%)	12 (54,5%)
<i>Sexo do doador</i>				
Masculino	32 (48,5%)	9 (40,9%)	12 (54,5%)	11 (50%)
Feminino	34 (51,5%)	13 (59,1%)	10 (45,5%)	11 (50%)
<i>Sexo doador/receptor</i>				
M/M	23 (34,8%)	5 (27,3%)	10 (45,5%)	8 (31,8%)
F/F	13 (19,7%)	2 (9,1%)	3 (13,6%)	8 (35,3%)
M/F	9 (13,6%)	3 (13,6%)	2 (9,1%)	4 (18,2%)
F/M	21 (31,8%)	12 (50%)	6 (31,8%)	3 (13,6%)
<i>Número de pacientes por categoria de idade</i>				
1 a 10 anos	9 (13,6%)	6 (27,3%)	-	3 (13,6%)
11 a 20 anos	24 (36,4%)	9 (40,9%)	7 (31,8%)	8 (36,4%)
21 a 40 anos	25 (37,9%)	5 (22,7%)	10 (45,5%)	10 (45,5%)
>40 anos	8 (12,1%)	2 (9,1%)	5 (22,7%)	1 (4,5%)
<i>Número de doadores por categoria de idade</i>				
1 a 10 anos	10 (15,1%)	5 (22,7%)	1 (4,5%)	4 (13,6%)
11 a 20 anos	13 (19,7%)	6 (27,2%)	5 (22,7%)	2 (9,1%)
21 a 40 anos	35 (53,1%)	9 (40,9%)	13 (59,1%)	13 (59,1%)
>40 anos	8 (12,1%)	2 (9,1%)	3 (13,6%)	3 (13,6%)
<i>Tempo entre diagnóstico e TMO (meses)</i>				
<2	32 (48,5%)	12 (54,6%)	7 (31,8%)	13 (59,1%)
2-6	18 (27,3%)	3 (13,6%)	8 (36,4%)	7 (31,8%)
7-12	7 (10,6%)	2 (9,1%)	4 (18,2%)	1 (4,5%)
>13	9 (13,6%)	5 (22,7%)	3 (13,6%)	1 (4,5%)
<i>Grupo ABO</i>				
Isogrupo	45 (68,2%)	16 (72,7%)	16 (72,7%)	13 (59,1%)
Incompatibilidade menor	2 (3%)	-	2 (9,1%)	-
Incompatibilidade maior	15 (22,7%)	5 (22,7%)	3 (13,6%)	7 (31,8%)
Incompatibilidade bidirecional	4 (6,1%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)	2 (9,1%)

continua

Tipo doador e compatibilidade HLA				
Relacionado 6x6	60 (90,9%)	19 (86,4%)	20 (90,9%)	21 (95,5%)
Relacionado haploidêntico mãe	2 (3%)	1 (4,5%)	-	1 (4,5%)
Não relacionado	4 (6,1%)	2 (9,1%)	2 (9,1%)	-
Fonte de células tronco				
Medula Óssea	63 (95,5%)	22 (100%)	21 (95,5%)	20 (90,9%)
CPH-SP	3 (4,5%)	-	1 (4,5%)	2 (9,1%)
Número de células infundidas em receptores de MO				
1 a $1,9 \times 10^8$ CNT/kg	4 (6,1%)	3 (13,6%)	-	1 (4,5%)
2 a $2,9 \times 10^8$ CNT/kg	17 (25,7%)	6 (27,3%)	9 (40,9%)	2 (9,1%)
>3 $\times 10^8$ CNT/kg	42 (63,7%)	13 (59,1%)	12 (54,6%)	17 (77,4%)
1 a 2×10^6 CD34+/kg	1 (1,5%)	-	-	1 (4,5%)
2 a 4×10^6 CD34+/kg	2 (3%)	-	1 (4,5%)	1 (4,5%)
>4 $\times 10^6$ CD34+/kg	-	-	-	-
Regime de condicionamento				
CY	25 (37,9%)	10 (45,5%)	6 (27,3%)	9 (40,9%)
CY + ATG	12 (18,2%)	3 (13,6%)	4 (18,2%)	5 (22,7%)
FLUBU (8)	3 (4,5%)	1 (4,5%)	1 (9,1%)	1 (4,5%)
FLUBU (12)	3 (4,5%)	-	1 (4,5%)	2 (9,1%)
FLU + CY + TBI	5 (7,6%)	3 (13,6%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)
BU (12) + CY	18 (27,3%)	5 (22,7%)	9 (40,9%)	4 (18,2%)
Números de transfusões antes do transplante				
<15 transfusões	24 (36,4%)	9 (40,9%)	5 (22,7%)	10 (45,4%)
>15 transfusões	42 (63,6%)	13 (59,1%)	17 (77,3%)	12 (54,5%)
Mediana de enxertia de neutrófilos em dias (Missing)	18 (2)	18 (1)	18 (1)	19 (0)
Mediana de enxertia de plaquetas em dias (Missing)	20 (6)	20 (4)	20 (2)	20 (0)
Profilaxia DECH				
CSA + MTX	62 (93,9%)	20 (90,9%)	21 (95,5%)	21 (95,5%)
CSA + MMF	4 (6,1%)	2 (9,1%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)
Ano TMO				
1992 – 2000	11 (16,7%)	5 (22,7%)	4 (18,2%)	2 (9,1%)
2001 – 2009	23 (34,8%)	6 (27,3%)	7 (31,8%)	10 (45,5%)
2010 – 2014	32 (48,5%)	11 (50%)	11 (50%)	10 (45,5%)

M: masculino; F: feminino; **HLA**: Antígeno Leucocitário Humano; **CPH-SP**: Células Progenitoras Hematopoéticas; **MO**: Medula Óssea; **CD34+**: glicoproteína transmembrana expressa em células progenitoras hematopoéticas; **CY**: Ciclofosfamida IV 200mg/kg; **CY+ATG**: Ciclofosfamida IV 200mg/kg + globulina antitímócito IV 4,5mg/kg; **FLUBU(12)**: Fludarabina IV 150mg/m² e Bussulfan VO 12mg/kg; **FLUBU(12)+ATG**: Fludarabina IV 150mg/m², Bussulfan VO 12mg/kg e globulina anti-tímócito IV 4,5mg/kg; **FLUBU(8)**: Fludarabina IV 150mg/m² e Bussulfan VO 8mg/kg; **FLU+CY+TBI**: Fludarabina IV 150mg/m², CY IV 29mg/kg e Irradiação corporal total 2Gy; **FLU+CY+TBI+ATG**: Fludarabina IV 150mg/m², CY IV 120mg/kg e Irradiação corporal total 2Gy e globulina anti-tímócito IV 4,5mg/kg; **BU(12)+CY**: Bussulfan VO 12mg/kg e Ciclofosfamida IV 120mg/kg; **DECH**: doença do enxerto contra o hospedeiro; **CSA**: ciclosporina IV 3mg/kg; **MTX**: Metotrexate IV 15mg/m² D+1 e 10mg/m² D+3, D+6, D+11; **MMF**: Micofenolato mofetil; **CY**: Ciclofosfamida IV 50mg/kg D+3 e D+4.

5.2.2 Comprimento telomérico do receptor e desfechos clínicos após o TMO

5.2.2.1 Comprimento telomérico do receptor e enxertia de neutrófilos e plaquetas

A mediana de enxertia de neutrófilos, em dias, foi de 18 nos grupos T1, T2 e de 19 no grupo T3. Dessa forma, optou-se por realizar a análise multivariada, utilizando o modelo de regressão por riscos competitivos, para a avaliação da associação de risco entre comprimento telomérico e enxertia de neutrófilos ajustado para idade do receptor e sexo do receptor e doador no total de transplantes ($n=66$). Não houve associação entre a enxertia de neutrófilos e o comprimento telomérico do receptor para os pacientes que realizaram TMO alogênico relacionado e não relacionado para AAG. Porém, observou-se que o grupo T1 apresentou enxertia de neutrófilos posterior ao grupo T2+T3. A incidência acumulada foi de 75,56% no grupo T1 vs 90,66% no grupo T2+T3 em 28 dias ($HR = 0,58$, $IC = 0,31 - 1,06$ e $p=0,07$ (Figura 10A).

Na análise dos grupos T1+T2 vs T3, a incidência acumulada de enxertia de neutrófilos foi semelhante: 84,44% e 91,11% em 28 dias, respectivamente ($HR = 0,78$; $IC = 0,50 - 1,21$ e $p=0,26$ (Figura 10B).

A mediana de enxertia de plaquetas, em dias, foi de 20 nos grupos T1, T2 e T3. Do mesmo modo, optou-se por realizar a análise multivariada, utilizando o modelo de regressão por riscos competitivos, para a avaliação da associação de risco entre comprimento telomérico e enxertia de plaquetas ajustado para idade do receptor e sexo do receptor e doador no total de transplantes ($n=66$). Não houve associação entre a enxertia de plaquetas e o comprimento telomérico do receptor nos pacientes submetidos ao TMO alogênico relacionado e não relacionado para AAG. Porém, observou-se que o grupo T1 apresentou enxertia de plaquetas posterior ao grupo T2+T3. A incidência acumulada foi de 68,89% no grupo T1 vs 87,77% no grupo T2+T3 em 28 dias ($HR = 0,54$, $IC = 0,28 - 1,06$ e $p=0,08$) (Figura 10C). A incidência acumulada de enxertia de plaquetas entre os grupos T1+T2 vs T3 foi semelhante: 80% e 88,88% em 28 dias, respectivamente ($HR = 0,75$, $IC = 0,43 - 1,31$ e $p=0,31$ (Figura 10D).

Figura 10: Incidência acumulada de enxertia de neutrófilos e plaquetas após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor. **(A)** A incidência acumulada de enxertia de neutrófilos em dias no grupo T1 foi de 75,56% vs 90,66% no grupo T2+T3. **(B)** A incidência acumulada de enxertia de neutrófilos no grupo T1+T2 foi de 84,44% vs 91,11% no grupo T3. **(C)** A incidência acumulada de enxertia de plaquetas em dias no grupo T1 foi de 68,89% vs 87,77% no grupo T2+T3. **(D)** A incidência acumulada de enxertia de plaquetas no grupo T1+T2 foi de 80% vs 88,88% no grupo T3.

5.2.2.2 Comprimento telomérico do receptor e DECH

No presente estudo, sete pacientes apresentaram DECH aguda grau I-II e nenhum paciente apresentou DECH aguda grau III-IV. Seis foram submetidos a TMO alogênico relacionado HLA-idêntico e apenas um paciente realizou TMO alogênico não relacionado HLA 10x10. Um paciente apresentava fonte CPH-SP. Devido a incidência de DECH aguda variar entre tipos de doadores, foi avaliada a associação de incidência de DECH aguda entre os grupos doador relacionado vs relacionado haploidêntico e não relacionado. Não houve associação entre DECH aguda e tipo de doador pelo teste exato de Fisher ($p=0,50$); e devido ao tamanho amostral e número de eventos serem pequenos, optou-se pela análise de riscos competitivos, incluindo TMO alogênico relacionado idêntico ($n=60$),

haploidêntico (n=2) e não relacionado (n=4); e como fonte de CPH: MO (n=63) e SP (n=3).

Durante a análise multivariada pelo método de regressão por riscos competitivos ajustado para a idade do receptor e sexo do receptor e doador, não se confirmou a associação dos grupos T1 vs T2+T3 com DECH aguda. A incidência acumulada foi de 10% em 100 dias nos grupos T1 e T2 +T3 ($HR = 1,14$; $IC = 0,20 - 6,65$; $p = 0,89$), (Figura 12A).

Nenhum dos pacientes do grupo T3, submetidos a TMO alogênico para AA, apresentou DECH aguda. Dessa forma, não foi possível aplicar a análise multivariada por modelo de regressão de riscos competitivos entre os grupos T1+T2 vs T3 e, assim, foi realizada a análise pelo teste de *log-Rank* - método Kaplan Meyer. Houve associação entre incidência de DECH aguda GI-II e o comprimento telomérico do receptor. A probabilidade de incidência de DECH aguda em 100 dias foi de 15,9% para o grupo T1+T2 vs 0% para o grupo T3, valor de $p=0,048$ (Figura 12B). A classificação da gravidade da DECH aguda, o tercil do comprimento telomérico, a idade do paciente e do doador, o sexo do paciente e do doador, o regime de condicionamento, a profilaxia de DECH e o *status* do quimerismo após o TMO estão descritos no Apêndice C.

Figura 11: Incidência acumulada de DECH aguda após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor. (A) A incidência acumulada para DECH em pacientes com anemia aplástica grave no grupo T1 e T2+T3 foi de 10%. (B) A probabilidade de DECH aguda no grupo T1 +T2 foi de 15,9% vs 0% no grupo T3, em pacientes com anemia aplástica grave, $p=0,048$, teste *log-Rank*.

Não se evidenciou associação do comprimento telomérico com a ocorrência de DECH crônica após o transplante. A incidência acumulada de DECH crônica dos receptores com telômero no primeiro tertil (T1) *versus* no segundo e terceiro tertis (T2 + T3) foi igual em ambos os grupos: 16,66% em um ano e 20% em dois anos ($HR = 1,01$; $IC = 0,25 - 4,18$; $p=0,99$). Também não houve associação entre os grupos T1+T2 *vs* T3 com DECH crônica. A incidência acumulada foi de 15,56% *vs* 13,34% em um ano e de 16,67% *vs* 20% em dois anos ($HR = 1,19$; $IC = 0,31 - 4,54$; $p=0,80$) (Figura 12). Foi realizada a análise multivariada pelo modelo de regressão de riscos competitivos ajustado para a idade do receptor e sexo do doador e receptor.

Figura 12. Incidência acumulada de DECH crônica após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor. **(A)** A incidência acumulada de DECH crônica em pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1 e T2+T3 foi de 16,66% em um ano e 20% em dois anos. **(B)** A incidência acumulada de DECH crônica em pacientes com anemia aplástica no grupo T1 +T2 foi de 15,56% em 1 ano e 20% em dois anos *vs* 13,34% em 1 ano e 16,67% em 2 anos no grupo T3.

5.2.2.3 Comprimento telomérico do receptor e falha de enxertia tardia

Não houve associação entre comprimento telomérico e risco de incidência de falha de enxertia tardia após o transplante. A incidência acumulada de falha de enxertia tardia entre T1 *vs* T2 + T3 foi de 2,22% *vs* 5,55% em um ano, de 5,55% *vs* 11,11% em três anos e de 7,77% *vs* 13,33 em cinco anos ($HR = 0,48$; $IC = 0,10 - 2,39$; $p=0,37$). Também não houve associação entre os grupos T1+T2 *vs* T3 com falha de enxertia. A incidência acumulada foi de 4,44% em ambos os grupos em um ano, de 6,66% *vs* 5,55% em três anos e de 8,88% *vs* 7,77% em cinco anos ($HR = 1,13$; $IC = 0,23 - 5,57$; $p=0,88$) (Figuras 13A e

13B). Foi realizada a análise multivariada pelo modelo de regressão de riscos competitivos ajustado para a idade do receptor e sexo do doador e receptor. Realizou-se também a análise por subgrupos de falha de enxertia secundária: perda do enxerto tardia e recuperação autóloga. Não houve associação entre comprimento telomérico e risco de incidência de perda do enxerto tardia após o transplante. A incidência acumulada para a perda do enxerto tardia entre T1 vs T2 + T3 foi de 1,11% vs 5,55% em um ano e de 2,22% vs 11,11% em três e cinco anos ($HR = 0,23$; $IC = 0,03 - 1,87$; $p=0,17$). Também não houve associação entre os grupos T1+T2 vs T3 com perda do enxerto. A incidência acumulada foi de 2,22% vs 4,44% em um e três anos e de 4,44% vs 13,34% em cinco anos ($HR = 0,50$; $IC = 0,06 - 4,51$; $p=0,54$) (Figuras 13C e 13D). Foi aplicada a análise multivariada pelo modelo de regressão de riscos competitivos ajustado para idade do receptor e sexo do doador e receptor. Não houve associação entre comprimento telomérico e risco de incidência de recuperação autóloga após o transplante. A incidência acumulada de recuperação autóloga entre T1 vs T2 + T3 foi de 1,77% vs 2,22% em um ano e três anos e de 2,22% vs 4,44% em cinco anos ($HR = 0,54$; $IC = 0,05 - 6,36$; $p=0,62$). Também não houve associação entre os grupos T1+T2 vs T3 com recuperação autóloga. A incidência acumulada em ambos os grupos foi de 2,22% em um ano e três anos e de 4,44% em cinco anos ($HR = 1,07$; $IC = 0,16 - 7,07$; $p = 0,95$) (Figuras 13E e 13F). Foi empregada a análise multivariada pelo modelo de regressão de riscos competitivos ajustado para idade do receptor e sexo do doador e receptor.

Figura 13: Incidência acumulada de falha de enxertia tardia e de perda do enxerto tardia e recuperação autóloga após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor. **(A)** A incidência acumulada de falha de enxertia tardia em pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1 vs T2+T3 foi de 2,22% vs 5,55% em um ano, de 5,55% vs 11,11% em três anos e de 7,77% vs 13,33 em cinco anos. **(B)** a incidência acumulada de falha de enxertia tardia em pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1+T2 vs T3 foi de 4,44% em ambos os grupos em um ano, de 6,66% vs 5,55% em três anos e de 8,88% vs 7,77% em cinco anos. **(C)** A incidência acumulada de perda do enxerto em pacientes com anemia aplástica grave por grupo T1 vs T2+T3 foi de 1,11% vs 5,55% em um ano e de 2,22% vs 11,11% em três e cinco anos. **(D)** A incidência acumulada de perda do enxerto em pacientes com anemia aplástica grave por grupo T1+T2 vs T3 foi de 2,22% vs 4,44% em um ano e três anos e de 4,44% vs 13,34% em cinco anos. **(E)** A incidência acumulada de recuperação autóloga em pacientes com anemia aplástica grave por grupo T1 vs T2+T3 foi de 1,77% vs 2,22% em um e três anos e de 2,22% vs 4,44% em cinco anos. **(F)** A incidência acumulada de recuperação autóloga em pacientes com anemia aplástica grave por grupo T1+T2 vs T3 foi de 2,22% em um ano e três anos e de 4,44% em cinco anos.

5.2.2.4 Comprimento telomérico do receptor e toxicidade relacionada ao TMO

Dentre as toxicidades relacionadas ao transplante, a mucosite e SOS foram analisadas. Não se observou associação entre o comprimento telomérico do receptor e a incidência de mucosite por meio do modelo de regressão logística. Este resultado foi ajustado para idade do receptor e sexo do receptor e doador e tipo de condicionamento em T1 vs T2+T3 ($OR = 1,86$; $IC = 0,52 - 6,71$; $p=0,34$) e em T1+T2 vs T3 ($OR = 1,69$; $IC = 0,46 - 6,21$; $p=0,43$). A incidência de SOS foi analisada pelo teste exato de Fisher e não houve associação do evento com os grupos T1 vs T2+T3 ($p=1,0$) ou T1+T2 vs T3 ($p=1,0$).

5.2.2.5 Comprimento telomérico do receptor e sobrevida global

A análise do comprimento telomérico do receptor não demonstrou associação com SG após o transplante. A probabilidade de SG dos receptores com telômero do primeiro tercil (T1) *versus* segundo e terceiro tertis (T2+T3) foi de 86,4% vs 93,2 % em um ano ($p=0,33$). A sobrevida média em dias no grupo T1 foi de 20,82 e no grupo T2 + T3 de 52,77 ($p=0,33$). Não houve associação entre os grupos T1 vs T2+T3 com SG. Foi realizada análise multivariada pelo modelo de riscos proporcionais de *Cox* ajustado para a idade do receptor e número de transfusões pré-transplante ($HR = 2,11$, $IC = 0,42 - 10,63$ e $p = 0,37$) (Figura 14A). A probabilidade de SG dos receptores com telômero do primeiro e segundo tertis (T1+ T2) *versus* terceiro tercil (T3) foi igual: 90,9% em um ano ($p=0,96$). A sobrevida média, em dias, no grupo T1+T2 foi de 24,21 e no grupo T3 de 52,86 ($p=0,96$). Não houve associação entre os grupos T1+T2 vs T3 com SG. Foi realizada a análise multivariada pelo modelo de riscos proporcionais de *Cox* ajustado para a idade do receptor e número de transfusões pré-transplante ($HR = 0,99$, $IC = 0,18 - 5,47$ e $p=0,99$) (Figura 14B).

Figura 14: Probabilidade de sobrevida global após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do receptor. **(A)** A probabilidade de sobrevida global em um ano para pacientes com anemia aplástica grave no grupo T1 foi de 86,4% vs 93,2% no grupo T2+T3. **(B)** A probabilidade de sobrevida global em um ano para pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1+T2 e T3 foi de 90,9% em ambos.

5.2.3 Comprimento telomérico do doador e características clínicas dos pacientes pré-TMO

As características clínicas dos pacientes transplantados para AAG estão descritas na Tabela 4 por tertis do comprimento telomérico do doador ajustado para idade.

Tabela 4: Características clínicas dos pacientes transplantados para anemia aplástica por tertis de comprimento telomérico do doador padronizado ajustado para idade.

<i>Características</i>	Todos	T1 < -0,644	Tertis -0,644 < T2 < 0,292	T3 > 0,292
<i>Média do comprimento telomérico padronizado do receptor (variação)</i>	0,004 (-1,901 a 3,565)	-0,829 (-1,901 a -0,372)	-0,007 (-0,709 a 0,764)	0,993 (0,30 a 3,565)
<i>Média do comprimento telomérico padronizado do receptor ajustado para idade (variação)</i>	-0,121 (-1,934 a 2,836)	-1,125 (-1,934 a -0,645)	-0,177 (-0,643 a -0,184)	0,938 (0,346 a 2,836)
<i>Número de doadores</i>	66 (100%)	22 (33,3%)	22 (33,3%)	22 (33,3%)
<i>Sexo do receptor</i>				
Masculino	44 (66,6%)	17 (77,3%)	13 (59,1%)	14 (63,6%)
Feminino	22 (33,3%)	5 (22,7%)	9 (40,9%)	8 (36,4%)
<i>Sexo do doador</i>				
Masculino	32 (48,5%)	9 (40,9%)	10 (45,5%)	13 (59,1%)
Feminino	34 (51,5%)	13 (59,1%)	12 (54,5%)	9 (40,9%)
<i>Sexo doador/receptor</i>				
M/M	23 (34,8%)	7 (31,8%)	6 (27,3%)	10 (45,5%)
F/F	13 (19,7%)	3 (13,6%)	5 (22,7%)	5 (22,7%)
M/F	9 (13,6%)	2 (9,1%)	4 (18,2%)	3 (13,6%)
F/M	21 (31,8%)	10 (45,5%)	7 (31,8%)	4 (18,2%)
<i>Número de doadores por categoria de idade</i>				
1 a 10 anos	10 (15,1%)	4 (18,2%)	3 (13,6%)	3 (13,6%)
11 a 20 anos	13 (19,7%)	5 (22,7%)	3 (13,6%)	5 (22,7%)
21 a 40 anos	35 (53%)	12 (54,5%)	13 (59,1%)	10 (45,4%)
> 40 anos	8 (12,2%)	1 (4,5%)	3 (13,6%)	4 (18,2%)
<i>Número de receptores por categoria de idade</i>				
1 a 10 anos	9 (13,6%)	5 (22,7%)	3 (13,6%)	1 (4,5%)
11 a 20 anos	24 (36,4%)	6 (27,3%)	9 (40,9%)	9 (40,9%)
21 a 40 anos	25 (37,9%)	9 (40,9%)	7 (31,8%)	9 (40,9%)
>40 anos	8 (12,1%)	2 (9,1%)	3 (13,6%)	3 (13,6%)
<i>Tempo entre diagnóstico e TMO (meses)</i>				
<2	32 (48,5%)	12 (54,5%)	10 (45,5%)	10 (45,5%)
2-6	18 (27,3%)	3 (13,6%)	7 (31,8%)	8 (36,3%)
7-12	7 (10,6%)	1 (4,5%)	4 (18,2%)	2 (13,6%)
>13	9 (13,6%)	6 (27,3%)	1 (4,5%)	2 (4,5%)
<i>Grupo ABO</i>				
Isogrupo	45 (68,2%)	19 (86,4%)	15 (68,3%)	11 (50%)
Incompatibilidade menor	2 (3%)	-	1 (4,5%)	1 (4,5%)
Incompatibilidade maior	15 (22,7%)	3 (13,6%)	5 (22,7%)	7 (31,8%)
Incompatibilidade bidirecional	4 (6,1%)	-	1 (4,5%)	3 (13,6%)
<i>Tipo doador e compatibilidade HLA</i>				
Relacionado 6x6	60 (90,9%)	18 (81,8%)	21 (95,5%)	21 (95,5%)
Relacionado haploidêntico mãe	2 (3%)	-	1 (4,5%)	1 (4,5%)
Não relacionado	4 (6,1%)	4 (18,2%)	-	-

continua

Fonte de células tronco				
Medula Óssea	63 (95,5%)	22 (100%)	22 (100%)	19 (86,4%)
CPH-SP	3 (4,5%)	-	-	3 (13,6%)
Número de células infundidas em receptores de MO				
1 a $1,9 \times 10^8$ CNT/kg	4 (6,1%)	3 (13,6%)	-	1 (4,5%)
2 a $2,9 \times 10^8$ CNT/kg	17 (25,8%)	6 (13,2%)	6 (27,3%)	5 (22,7%)
>3 x 10^{10} CNT/kg	42 (63,6%)	13 (59,1%)	16 (72,7%)	13 (59,1%)
1 a 2×10^6 CD34+/kg	2 (3%)	-	-	2 (9,1%)
2 a 4×10^6 CD34+/kg	1 (1,5%)	-	-	1 (4,5%)
>4 x 10^6 CD34+/kg	-	-	-	-
Regime de condicionamento				
CY	25 (37,9%)	12 (54,5%)	9 (40,9%)	4 (18,2%)
CY + ATG	12 (18,2%)	1 (4,5%)	4 (18,2%)	7 (31,8%)
FLUBU (8)	3 (4,5%)	1 (4,5%)	2 (9,1%)	-
FLUBU (12)	3 (4,5%)	-	-	3 (13,6%)
FLU + CY + TBI	5 (7,6%)	3 (13,6%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)
BU (12) + CY	18 (27,3%)	5 (22,7%)	6 (27,3%)	7 (31,8%)
Números de transfusões antes do transplante				
<15 transfusões	24 (36,4%)	9 (40,9%)	9 (40,9%)	6 (27,3%)
>15 transfusões	42 (63,6%)	13 (59,1%)	13 (59,1%)	16 (72,7%)
Mediana de enxertia de neutrófilos em dias (Missing)	19 (2)	21 (1)	18 (1)	18 (0)
Mediana de enxertia de plaquetas em dias (Missing)	20 (6)	22 (4)	19 (2)	20 (0)
Profilaxia DECH				
CSA + MTX	62 (93,9%)	20 (90,9%)	21 (95,5%)	21 (95,5%)
CSA + MMF	4 (6,1%)	2 (9,1%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)
Ano TMO				
1992-2000	11 (16,7%)	5 (22,7%)	5 (22,7%)	1 (4,5%)
2001-2009	23 (34,8%)	7 (31,8%)	10 (45,5%)	6 (27,3%)
2010-2014	32 (48,5%)	10 (45,5%)	7 (31,8%)	15 (68,2%)

M: masculino; **F:** feminino; **CY:** Ciclofosfamida IV 200mg/kg; **CY+ATG:** Ciclofosfamida IV 200mg/kg + globulina antitímócito IV 4,5mg/kg; **FLUBU(12):** Fludarabina IV 150mg/m² e Bussulfan VO 12mg/kg; **FLUBU(12)+ATG:** Fludarabina IV 150mg/m², Bussulfan VO 12mg/kg e globulina anti-tímócito IV 4,5mg/kg; **FLUBU(8):** Fludarabina IV 150mg/m² e Bussulfan VO 8mg/kg; **FLU+CY+TBI:** Fludarabina IV 150mg/m², CY IV 29mg/kg e Irradiação corporal total 2Gy; **FLU+CY+TBI+ATG:** Fludarabina IV 150mg/m², CY IV 120mg/kg e Irradiação corporal total 2Gy e globulina anti-tímócito IV 4,5mg/kg; **BU(12)+CY:** Bussulfan VO 12mg/kg e Ciclofosfamida IV 120mg/kg; **DECH:** doença do enxerto contra o hospedeiro; **CSA:** ciclosporina IV 3mg/kg; **MTX:** Metotrexate IV 15mg/m² D+1 e 10mg/m² D+3, D+6, D+11; **MMF:** Micofenolato mofetil; **CY:** Ciclofosfamida IV 50mg/kg D+3 e D+4.

5.2.4 Comprimento telomérico do doador e desfechos clínicos após o TMO

5.2.4.1 Comprimento telomérico do doador e enxertia de neutrófilos e plaquetas

A mediana de enxertia de neutrófilos, em dias, foi de 21 no grupo T1; 18 nos grupos T2 e T3. Dessa forma, optou-se por realizar a análise multivariada, utilizando o modelo de regressão por riscos competitivos, para avaliação da associação de risco entre comprimento telomérico e enxertia de neutrófilos ajustado para idade do receptor e sexo de receptor e doador no total de transplantes (n=66). Não houve associação entre a enxertia de neutrófilos e o comprimento telomérico do doador para os pacientes que realizaram TMO alogênico relacionado e não relacionado para AAG.

Observou-se que o grupo T1 apresentava enxertia de neutrófilos semelhante ao grupo T2+T3. A incidência acumulada foi de 82,35% no grupo T1 vs 89,45% no grupo T2+T3 em 28 dias ($HR = 0,76$, $IC = 0,44 - 1,29$ e $p=0,31$) (Figura 15A).

Na análise dos grupos T1+T2 vs T3, a incidência acumulada de enxertia de neutrófilos foi de 84,7% vs 91,76% em 28 dias, respectivamente ($HR = 0,81$; $IC = 0,45 - 1,45$ e $p=0,48$) (Figura 15B).

A mediana de enxertia de plaquetas, em dias, foi de 22 no grupo T1; 19 no grupo T2 e 20 no grupo T3. Do mesmo modo, optou-se pela análise multivariada, utilizando o modelo de regressão por riscos competitivos para avaliação da associação de risco entre comprimento telomérico e enxertia de plaquetas ajustado para idade do receptor e, sexo de receptor e doador no total de transplantes (n=66). Não foi observada associação entre a enxertia de plaquetas e o comprimento telomérico do doador nos pacientes submetidos a TMO alogênico relacionado e não relacionado para AAG. Porém, notou-se que o grupo T1 apresentou enxertia de plaquetas posterior ao grupo T2+T3. A incidência acumulada foi de 73,34% no grupo T1 vs 86,66% no grupo T2+T3 em 28 dias ($HR = 0,62$, $IC = 0,36 - 1,07$ e $p=0,09$) (Figura 15C). A incidência acumulada de enxertia de plaquetas entre os grupos T1+T2 vs T3 foi semelhante: 82,22% e 84,44% em 28 dias, respectivamente ($HR = 0,93$, $IC = 0,54 - 1,58$ e $p=0,31$) (Figura 15D).

Figura 15: Incidência acumulada de enxertia de neutrófilos e de plaquetas após o TMO para pacientes com AAG por grupos de comprimento telomérico do doador. (A) A incidência acumulada de enxertia de neutrófilos em dias no grupo T1 foi de 82,35% vs 89,45% no grupo T2+T3. (B) A incidência acumulada de enxertia de neutrófilos no grupo T1+T2 foi de 84,70% vs 91,76% no grupo T3. (C) A incidência acumulada de enxertia de plaquetas em dias no grupo T1 foi de 73,34% vs 86,66% no grupo T2+T3. (D) A incidência acumulada de enxertia de plaquetas no grupo T1+T2 foi de 82,22% vs 84,44% no grupo T3.

5.2.4.2 Comprimento telomérico do doador e DECH

Durante a análise multivariada, pelo método de regressão por riscos competitivos, ajustado para a idade do receptor e sexo do receptor e doador, não se confirmou a associação dos grupos T1 vs T2+T3 com DECH aguda. A incidência acumulada entre os grupos T1 vs T2+T3 foi de 17,78% vs 4,44% em 100 dias ($HR = 3,81$; $IC = 0,66 - 21,92$; $p=0,13$) (Figura 16A). A incidência acumulada de DECH aguda entre os grupos T1+T2 vs T3 foi de 10% vs 6,66% em 100 dias ($HR = 1,51$; $IC = 0,26 - 8,83$; $p=0,65$) (Figura 16B).

Figura 16: Incidência acumulada de DECH aguda após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador. **(A)** A incidência acumulada para DECH aguda em pacientes com anemia aplástica grave no grupo T1 foi de 17,78% vs 4,44% no grupo T2+T3. **(B)** A incidência acumulada para DECH aguda em pacientes com anemia aplástica grave no grupo T1+T2 foi de 10% vs 6,66% no grupo T3.

Não houve associação entre comprimento telomérico e DECH crônica após o transplante. A incidência acumulada de DECH crônica nos pacientes com telômero do doador no primeiro tertil (T1) *versus* no segundo e no terceiro tertis (T2+T3) foi de 17,78% em um ano e de 20% em dois anos ($HR = 0,95$; $IC = 0,25 - 3,56$; $p = 0,94$). Também não se observou associação entre os grupos T1+T2 vs T3 com DECH crônica. A incidência acumulada foi de 15,56% vs 22,22% em um ano e de 17,78% vs 26,66% em dois anos ($HR = 0,68$; $IC = 0,21 - 2,21$; $p=0,52$) (Figura 17). Foi realizada análise multivariada pelo modelo de regressão de riscos competitivos ajustado para idade do receptor e sexo do doador e receptor.

Figura 17: Incidência acumulada de DECH crônica após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador. **(A)** A incidência acumulada de DECH crônica em pacientes com anemia aplástica grave no grupo foi de T1 e T2+T3 foi de 17,78% em um ano e 20% em dois anos. **(B)** A incidência acumulada de DECH crônica nos pacientes com anemia aplástica grave no grupo T1+T2 foi de 15,56% em um ano e 17,78% em dois anos vs 22,22% em um ano e 26,66% em dois anos no grupo T3.

5.2.4.3 Comprimento telomérico do doador e falha de enxertia tardia

Não houve associação entre comprimento telomérico e risco de incidência de falha de enxertia tardia após o transplante. A incidência acumulada de falha de enxertia tardia entre T1 vs T2+T3 foi de 9,41% vs 4,7% em um ano e de 17,65% vs 7,25 % em três anos, de 20% vs 10,58 % em cinco anos ($HR = 1,99$; $IC = 0,51 - 7,87$; $p=0,32$). Também não se evidenciou associação entre os grupos T1+T2 vs T3 com falha de enxertia. A incidência acumulada foi de 7,25% vs 2,11 % em um ano, de 15,3% vs 3,28% em três anos e de 17,65% vs 3,75% em cinco anos ($HR = 4,08$; $IC = 0,44 - 37,66$; $p=0,22$) (Figuras 18A e 18B). Foi realizada análise multivariada, pelo modelo de regressão de riscos competitivos, ajustado para a idade do receptor e sexo do doador e receptor. Realizou-se também a análise por subgrupos de falha de enxertia secundária: perda do enxerto tardia e recuperação autóloga. Não houve associação entre comprimento telomérico e risco de incidência de perda do enxerto tardia após o transplante. A incidência acumulada para a perda do enxerto tardia nos grupos T1 e T2+T3 foi de 4,44% em um ano e de 10% em três e cinco anos em ambos os grupos, ($HR = 1,02$; $IC = 0,20 - 5,29$; $p=0,98$). Também não houve associação entre os grupos T1+T2 vs T3 com perda do enxerto. A incidência acumulada foi de 5,55% vs 2,22% em um ano e de 12,22% vs 4,44% em três e cinco anos

($HR = 2,40$; $IC = 0,26 - 22,24$; $p=0,44$) (Figuras 18C e 18D). Foi aplicada a análise multivariada, pelo modelo de regressão de riscos competitivos, ajustado para idade do receptor e sexo do doador e receptor. Não houve associação entre comprimento telomérico e risco de incidência de recuperação autóloga após o transplante. A incidência acumulada de recuperação autóloga entre T1 vs T2+T3 foi de 4,44% vs 2,22% em um ano e três anos e de 6,66% vs 5,55% em cinco anos ($HR = 2,21$; $IC = 0,18 - 27,73$; $p=0,54$). Não foi possível avaliar a associação entre os grupos T1+T2 vs T3 e recuperação autóloga na análise multivariada pelo modelo de regressão de riscos competitivos, pois não houve evento no grupo T3.

Figura 18: Incidência acumulada de falha de enxertia tardia e de perda do enxerto tardia e recuperação autóloga após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador. **(A)** A incidência acumulada de falha de enxertia tardia em pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1 vs T2+T3 foi de 7,25% vs 2,11 % em um ano, de 15,3% vs 3,28% em três anos e de 17,65% vs 3,75% em cinco anos. **(B)** A incidência acumulada de falha de enxertia tardia em pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1+T2 vs T3 foi de 7,25% vs 2,11 % em um ano, de 15,3% vs 3,28% em três anos e de 17,65% vs 3,75% em cinco anos. **(C)** A incidência acumulada de perda do enxerto em pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1 e T2 + T3 foi de 4,44% em um ano e de 10% em três e cinco anos. **(D)** A incidência acumulada de perda do enxerto em pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1+T2 vs T3 foi de 5,55% vs 2,22% em um ano e de 12,22% vs 4,44% em três e cinco anos. **(E)** A incidência acumulada de recuperação autóloga em pacientes com anemia aplástica grave por grupo T1 vs T2+T3 foi de 4,44% vs 2,22% em um e três anos e de 6,66% vs 5,55% em cinco anos. **(F)** A incidência acumulada de recuperação autóloga em pacientes com anemia aplástica grave nos grupo T1 vs T2+T3.

5.2.4.4 Comprimento telomérico do doador e toxicidade relacionada ao TMO

Dentre as toxicidades relacionadas ao transplante, a mucosite e SOS foram analisadas. Não se verificou associação entre o comprimento telomérico do doador e a incidência de mucosite por meio do modelo de regressão logística. Este resultado foi ajustado para idade do doador, sexo do doador e receptor e tipo de condicionamento em T1 vs T2+T3 ($OR = 2,08$; $IC = 0,61 - 7,11$; $p=0,24$) e em T1+T2 vs T3 ($OR = 1,79$; $IC = 0,48 - 6,63$; $p=0,39$). A incidência de SOS foi analisada pelo teste exato de Fisher e não houve associação com grupos T1 vs T2+T3 ($p=1,0$) ou T1+T2 vs T3 ($p=0,59$).

5.2.4.5 Comprimento telomérico do doador e sobrevida global

A análise do comprimento telomérico do doador não demonstrou associação com SG após o transplante. A probabilidade de SG dos pacientes com telômero do primeiro tercil (T1) versus segundo e terceiro tertis (T2+T3) foi igual em ambos grupos: 90,9% em um ano ($p=0,98$). A sobrevida média em dias no grupo T1 foi de 24,1 e no grupo T2 + T3 de 51,8 ($p=0,98$) e não houve associação entre os grupos T1 vs T2+T3 com SG. Foi realizada análise multivariada, pelo modelo de riscos proporcionais de Cox, ajustado para a idade do receptor e número de transfusões pré-transplante ($HR = 0,98$, $IC = 0,18 - 5,40$ e $p=0,98$) (Figura 19A). A probabilidade de SG dos pacientes com telômero no primeiro e segundo tercil (T1+T2) versus terceiro tercil (T3) pré-transplante foi igual: 90,9% em um ano ($p=0,98$). A sobrevida média, em dias, no grupo T1+T2 foi de 28 e no grupo T3 de 52,55 ($p=0,98$). Não houve associação entre os grupos T1+T2 vs T3 com SG na análise multivariada pelo modelo de riscos proporcionais de Cox, ajustado para a idade do receptor e número de transfusões pré-transplante ($HR = 1,09$, $IC = 0,19 - 6,12$ e $p=0,92$), (Figura 19B).

Figura 19: Probabilidade de sobrevida global após o TMO para pacientes com anemia aplástica grave por grupos de comprimento telomérico do doador **(A)** A probabilidade de sobrevida global para pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1 e T2+T3 foi de 90,9% em ambos. **(B)** A probabilidade de sobrevida global para pacientes com anemia aplástica grave nos grupos T1+T2 e T3 foi de 90,9% em ambos.

Na Tabela 5 encontra-se o resumo da associação do comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico pré-transplante do receptor e doador com os principais desfechos após o TMO.

Tabela 5: Comprimento telomérico dos leucócitos do PB do receptor e doador: associação com os desfechos clínicos.

	Comprimento telomérico dos leucócitos do receptor				Comprimento telomérico dos leucócitos do doador			
	Número de eventos/tamanho da amostra				Número de eventos/tamanho da amostra			
	T1	T2+T3	HR ajustado (IC95%)	p	T1	T2+T3	HR ajustado (IC 95%)	p
Enxertia de neutrófilos	18/21*	43/43	0,58 (0,31 - 1,06)	0,07	20/21	41/43*	0,76 (0,44 - 1,29)	0,31
Enxertia de plaquetas	14/18*	41/42	0,54 (0,28 - 1,06)	0,08	16/18	39/42*	0,62 (0,36 - 1,07)	0,09
DECH aguda GI-II	2/20	5/44	1,14 (0,20 - 6,65)	0,89	4/21	3/41	3,81 (0,66 - 1,92)	0,13
DECH crônica	4/19	9/41	1,01 (0,25 - 4,18)	0,99	4/20	9/40	0,95 (0,25 - 3,56)	0,94
Falha de enxertia tardia	2/19	7/41	0,48 (0,10 - 2,39)	0,37	4/20	5/40	1,99 (0,51 - 7,87)	0,32
Perda do enxerto	1/19	5/41	0,23 (0,03 - 1,87)	0,17	2/20	4/40	1,02 (0,20 - 5,29)	0,98
Recuperação Autóloga	1/19	3/41	0,54 (0,05 - 6,36)	0,62	2/20	2/40	2,21 (0,18 - 7,73)	0,54
Sobrevida global	3/22	3/44	2,11 (0,42 - 10,63)	0,37	2/22	4/44	0,98 (0,18 - 5,40)	0,98
	T1+T2	T3	HR ajustado (IC95%)	p	T1+T2	T3	HR ajustado (IC 95%)	p
Enxertia de neutrófilos	39/42*	22/22	0,78 (0,50 - 1,21)	0,26	39/42*	22/22	0,81 (0,45 - 1,45)	0,48
Enxertia de plaquetas	33/38*	22/22	0,75 (0,43 - 1,31)	0,31	34/38*	21/22	0,93 (0,54 - 1,58)	0,31
DECH aguda GI-II	7/43	0/20	-	0,048	5/41	2/21	1,51 (0,26 - 8,83)	0,65
DECH crônica	9/40	4/22	1,19 (0,31 - 4,54)	0,80	8/40	5/20	0,68 (0,21 - 2,21)	0,52
Falha de enxertia tardia	5/40	4/20	1,13 (0,23 - 5,57)	0,88	8/40	1/20	4,08 (0,44 - 37,66)	0,22
Perda do enxerto	3/40	3/20	0,50 (0,06 - 4,51)	0,54	5/40	1/20	2,40 (0,26 - 22,24)	0,44
Recuperação Autóloga	2/40	2/20	1,07 (0,16 - 7,07)	0,95	4/40	0/20	-	-
Sobrevida global	4/44	2/22	0,99 (0,18 - 5,47)	0,99	4/44	2/22	1,09 (0,19 - 6,12)	0,92

T1: primeiro tercil ou telômero curto; **T3:** terceiro tercil ou telômero longo. **HR:** Hazard Ratio; **DECH:** Doença do enxerto contra o hospedeiro; *1 evento foi falha de enxertia primária. A análise de sobrevida global foi ajustada para idade do paciente, sexo do paciente e do doador e número de transfusões. A análise de DECH aguda e crônica, falha de enxertia, perda do enxerto e recuperação autóloga foi ajustada para idade do paciente e sexo do paciente e do doador.

6. Discussão

6.1 Avaliação do comprimento telomérico: associação com o TMO alogênico para anemia aplástica

Atualmente, o TMO alogênico de doador relacionado HLA idêntico é recomendado para pacientes jovens com diagnóstico de AAG, enquanto a terapia imunossupressora é frequentemente utilizada para os idosos ou jovens sem doador relacionado compatível⁶⁴. A resposta ao TMO depende da ocorrência ou não de complicações relacionadas ao tratamento como: falha de enxertia, DECH, retardo da reconstituição imune com aumento para risco de complicações infecciosas¹²⁶.

A estimativa da taxa de SG ou da TRM é importante na avaliação de risco e benefício do TMO. Os fatores de risco avaliados, atualmente, são: idade do receptor e doador e comorbidades do paciente pré-transplante^{126,127}. Alguns exames séricos, como a ferritina e a proteína C reativa, têm sido avaliados como possíveis indicadores de risco de morbi-mortalidade após o transplante^{128,129}.

Como descrito previamente, o comprimento telomérico é um marcador de senescência e capacidade replicativa das células. Dessa forma, o estudo do comprimento telomérico é oportuno no ambiente de alta proliferação celular como o transplante. Vários estudos demonstraram o encurtamento telomérico após o TMO quando comparado com o comprimento telomérico de doadores compatíveis¹³⁰⁻¹³³.

Nesse contexto, este estudo avaliou a associação do comprimento telomérico do receptor e doador pré-TMO alogênico para AA, como possível marcador biológico para os eventos clínicos enxertia de neutrófilos e plaquetas, DECH aguda e crônica, falha de enxertia tardia e toxicidade relacionada ao transplante como mucosite e SOS e SG.

A predisposição genética como as mutações nos genes do complexo da telomerase, os fatores ambientais como o *stress* oxidativo e as intervenções iatrogênicas como as drogas quimioterápicas e a radioterapia podem acelerar o encurtamento telomérico¹³⁵.

No presente estudo, nos pacientes com telômero curto, classificados no primeiro tercil, casos não identificados de mutações nos genes do complexo da telomerase podem existir. Mutações nos genes TERC ou TERT têm sido identificadas em 5 - 10% dos casos de AA adquirida sem anormalidades físicas associadas^{17,19}. Estudos recentes sugerem que até um terço dos pacientes com AAG apresentam telômero curto²⁰⁻²².

Os valores do comprimento telomérico, encontrado nos pacientes deste estudo, estão dentro da variação esperada para a idade. A mediana por faixa etária foi menor que a dos doadores, exceto na faixa etária de 21 a 40 anos, em que os valores T/S foram

semelhantes. Este resultado corrobora os achados do estudo prévio¹³⁴ (n=178 pacientes, sendo 86% transplantados para doença hematológica maligna), que demonstrou comprimento telomérico menor nos pacientes do que nos doadores relacionados em todas as faixas etárias.

Os pontos favoráveis deste estudo incluem uma coorte homogênea de pacientes com diagnóstico de AAG de dois centros transplantadores. A maioria realizou transplante com doadores relacionados (n=60) e possuía a mesma profilaxia de DECH. Os pontos limitantes se consistiram por se tratar de um estudo retrospectivo com número relativamente pequeno de pacientes e de eventos analisados nos desfechos clínicos após o transplante.

6.1.1 Avaliação do comprimento telomérico: associação com a enxertia após o TMO

A enxertia de neutrófilos e plaquetas ocorreu em todos os pacientes, exceto em um paciente, em que foi considerada a falha primária no D+24. A maioria realizou TMO alogênico para AA com número adequado de CPH, sendo que quatro pacientes receberam menos que $2 \times 10^8/\text{kg}$ de células nucleadas e um paciente recebeu menos que $2 \times 10^6/\text{kg}$ CPH-SP.

Observou-se, no presente estudo, que a enxertia de neutrófilos e plaquetas dos pacientes com telômero curto, classificados no primeiro tercil (T1), foi mais tardia em relação aos demais pacientes, apesar de não ter sido observada significância estatística. A incidência acumulada de enxertia de neutrófilos foi de 75,56% no grupo T1 vs 90,66% no grupo T2+T3 em 28 dias ($HR = 0,58$, $IC = 0,31 - 1,06$ e $p=0,07$) e de plaquetas foi de 68,89% no grupo T1 vs 87,77% no grupo $p = T2+T3$ em 28 dias ($HR = 0,54$, $IC = 0,28 - 1,06$ e $p=0,08$). Pode-se observar também que a enxertia de plaquetas foi mais tardia nos pacientes que possuíam doadores com telômero curto, apesar de não ter sido evidenciada significância estatística. A incidência acumulada de enxertia de plaquetas foi de 73,34% no grupo T1 vs 86,66% no grupo T2+T3 em 28 dias ($HR = 0,62$, $IC = 0,36 - 1,07$ e $p=0,09$).

A correlação entre comprimento telomérico e enxertia de granulócitos mantém se controversa^{140,141}. O telômero curto foi associado com enxertia de neutrófilos menos eficiente em 36 pacientes que realizaram transplante autólogo com número adequado de CPH $CD34+$ ¹⁴⁰. Outro estudo demonstrou correlação positiva entre comprimento

telomérico do doador e capacidade regenerativa das CPH *in vitro*, porém não houve associação com a enxertia medular em 47 transplantes alogênicos¹⁴¹. Um estudo experimental demonstrou que a disfunção telomérica pode induzir mudanças no nicho medular que limita a função e a enxertia das CPH¹⁴².

O encurtamento telomérico pode levar à indução da sinalização de dano ao DNA e tem sido associado com idade e declínio das células-tronco¹⁴²⁻¹⁴⁴. A disfunção do nicho medular está associada com a idade e com a progressão do encurtamento telomérico das células estromais da MO em um estudo com modelo murino¹⁴².

A disfunção do telômero reduz capacidade das células estromais em manter a função e a enxertia das CPH-MO¹⁴². Um estudo demonstrou boa correlação entre o comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico, da mucosa oral e do fibroblasto, sugerindo que o comprimento telomérico dos leucócitos pode refletir o comprimento telomérico em outros tecidos¹⁴⁶.

Dessa forma, este estudo sugere a hipótese de que o telômero curto dos leucócitos do PB pode refletir o telômero das células estromais da MO, que, por sua vez, ocasiona a disfunção do nicho medular por meio da redução da função e enxertia das CPH. No entanto, a realização de estudo experimental torna-se necessário para confirmar essa hipótese. Por outro lado, o telômero longo do doador foi correlacionado com enxertia de granulócitos mais precoce em um estudo com 19 crianças¹⁴⁷). Nos resultados do presente estudo não houve associação entre o telômero longo do doador com a enxertia de neutrófilos e plaquetas. Na análise dos grupos T1+T2 *vs* T3, a incidência acumulada de enxertia de neutrófilos foi de 84,7% *vs* 91,76% em 28 dias, respectivamente ($p=0,48$) e a incidência acumulada de enxertia de plaquetas entre os grupos T1+T2 *vs* T3 foi semelhante: 82,22% e 84,44% em 28 dias, respectivamente ($p=0,31$). Também não houve associação entre telômero longo do receptor com enxertia de neutrófilos ou plaquetas neste estudo. Na análise dos grupos T1+T2 *vs* T3, a incidência acumulada de enxertia de neutrófilos foi semelhante: 84,44% e 91,11% em 28 dias, respectivamente ($p=0,26$). A incidência acumulada de enxertia de plaquetas entre os grupos T1+T2 *vs* T3 foi semelhante: 80% e 88,88% em 28 dias, respectivamente ($p=0,31$).

6.1.2 Avaliação do comprimento telomérico: associação com DECH após o TMO

Apesar dos avanços na prevenção e terapias imunossupressoras após o transplante, a DECH aguda permanece como uma das maiores causas de morbimortalidade após o TMO alogênico¹⁴⁸.

Nesta casuística, observou-se a ocorrência de DECH aguda em sete pacientes transplantados (n=66). Seis pacientes realizaram TMO com doador relacionado HLA 6x6 e um paciente, com doador não relacionado HLA 10x10. Seis receberam fonte de CPH-MO e um paciente recebeu fonte de CPH-SP.

Em um estudo com 1448 pacientes transplantados para AAG do *EBMT group*¹⁴⁸, a incidência de DECH aguda grau II-IV foi maior no grupo de doadores não relacionados (23% vs 15%, $p<0,0001$). No entanto, no presente estudo, a avaliação de incidência de DECH aguda entre os grupos doador relacionado vs relacionado haploidêmico e não relacionado não demonstrou significância estatística ($p=0,50$). Assim, optou-se por realizar a avaliação de associação de DECH aguda e comprimento telomérico nos transplantes alogênicos com doadores relacionados e não relacionados. E, devido ao pequeno número de eventos de DECH aguda grau I (n=5) e grau II (n=2) e a baixa incidência de DECH aguda nos transplantes para AA, decidiu-se avaliar os eventos de DECH aguda grau I e II.

Este estudo demonstrou que pacientes com telômero longo apresentaram menor incidência de DECH aguda após TMO alogênico para AAG. A probabilidade de incidência de DECH aguda em 100 dias foi de 15,9% para o grupo T1+T2 vs 0% para o grupo T3, valor de $p=0,048$. É importante ressaltar que não foi possível realizar análise estatística multivariada ajustada para idade e sexo do doador.

Até o presente momento, não há estudos demonstrando a associação entre comprimento telomérico e DECH aguda. Estudos experimentais serão necessários para confirmação e melhor elucidação da associação entre telômero longo do receptor e incidência de DECH aguda no contexto do TMO alogênico.

A fisiopatologia da DECH aguda pode ser descrita em três fases. A fase aferente se constitui por danos ao tecido do hospedeiro por quimio e radioterapia, principalmente em pele, fígado e trato gastrointestinal, resultando na liberação de várias citocinas (IL-1, TNF- α , IL-6 e INF- γ), que ativam as células T e as APC^{99,101,149,150}.

Depois que as células do doador são infundidas no paciente, elas interagem com os monócitos e macrófagos do receptor que, em resposta ao regime de condicionamento secretam IL-12. Eles então interagem com as células T CD4+ e CD8+ virgens do doador

que, por sua vez, secretam quantidades significativas de IFN-gama. Esse fato tem efeito exponencial na expansão das células T, resultando em DECH aguda^{99,101,149,150}. Dessa forma, estudos futuros poderiam investigar se há diferença nas vias de atuação dos monócitos e macrófagos dos pacientes com telômero longo.

A segunda fase da DECH aguda é caracterizada pela ativação das células T por meio da ligação dos seus receptores para antígenos (*T cell receptor*, TCR) com as moléculas de MHC (complexo principal de histocompatibilidade), presentes nas APC do doador ou do hospedeiro. As APC fagocitam as proteínas estranhas por meio de endocitose, ou no contexto de um complexo imune, que é processado e apresentado como um peptídeo na molécula de MHC^{99,101,149,150}. Também nessa fase, estudos experimentais poderiam ser realizados para avaliar a atuação das APC e a sua associação com o telômero do receptor. Na terceira fase da DECH aguda, também denominada fase efetora, as células T ativadas e expandidas começam a atuar nos tecidos do hospedeiro. Um fator importante é a interação entre diferentes subpopulações de células T, pois se as células T polarizam em direção a via Th1, ocorrerá uma resposta de células T citotóxicas (CD8+), típica da DECH aguda, ao lado de citocinas pró-inflamatórias^{149,151}. Na ausência de IFN-gama (Th1) ocorre diferenciação das células T virgens para a via Th17, que produz lesão cutânea¹⁵². Assim, o papel clássico da via Th1 parece ser predominante nas lesões hepáticas e intestinais; e a via Th17 nas lesões cutâneas. Seis pacientes do presente estudo apresentaram DECH aguda com acometimento cutâneo e um paciente apresentou acometimento hepático e cutâneo.

As células T regulatórias parecem ser deficientes em pacientes com DECH aguda, tanto no sangue como nos tecidos. Em estudos com modelo murino, a infusão de células T regulatórias reduziu a incidência de DECH aguda^{153,154}. Assim, estudos futuros poderão avaliar a associação entre comprimento telomérico do receptor e vias de ativação das células T, que ocorre na fase efetora.

Não houve associação entre telômero longo do doador e incidência de DECH aguda ($p=0,65$); telômero curto do doador e incidência de DECH aguda ($p=0,13$) e telômero curto do receptor e incidência de DECH aguda ($p=0,89$). Também não houve associação do comprimento telomérico do receptor e do doador com a DECH crônica após o transplante. O resultado do presente estudo está em acordo com os dados reportados previamente ($n=178$), que não demonstraram associação estatística significativa entre DECH crônica e comprimento telomérico em pacientes submetidos a TMO alogênico para

doença onco-hematológica, em sua maioria¹³⁴. Também não houve associação entre DECH crônica e comprimento telomérico em 330 pacientes que realizaram TMO alogênico não relacionado para AA¹³⁵. No entanto, um estudo reportou a flutuação do comprimento telomérico dos neutrófilos e linfócitos em cinco pacientes submetidos ao transplante alogênico e em três ocorreu encurtamento do comprimento telomérico com evidência de DECH crônica¹⁵⁵. O telômero curto também foi associado com doadores idosos, do sexo feminino, e com a ocorrência de DECH crônica em 44 pacientes que realizaram TMO alogênico¹³⁰.

A avaliação do comprimento telomérico e da atividade da telomerase em células T CD4+ convencionais e células T regulatórias de 61 pacientes que realizaram transplante alogênico demonstrou menor comprimento telomérico das células T regulatórias em relação às células T convencionais. O número de células T regulatórias e a atividade da telomerase estavam inversamente correlacionados com a gravidade da DECH crônica¹⁵⁶.

6.1.3 Avaliação do comprimento telomérico: associação com a falha de enxertia secundária após o TMO

A falha de enxertia com pancitopenia persistente é bem documentada após o TMO alogênico para AAG e o prognóstico é reservado. A recuperação autóloga da hematopoese do receptor após o TMO alogênico é um evento raro e a SG, após o TMO alogênico, é de aproximadamente 84%, conforme relatado em um estudo com 1205 pacientes do grupo *WPSSA - EBMT*⁹⁸.

A associação de menor comprimento telomérico com recaída da doença, transformação maligna e diminuição da sobrevida foi demonstrada em 183 pacientes com AAG tratados com terapia imunossupressora⁴¹. O telômero curto também foi reportado como possível mecanismo para falha de enxertia tardia em um relato de dois casos¹⁵⁷. Nos resultados do presente estudo, não houve associação do comprimento telomérico do receptor e doador com a falha de enxertia após o transplante. Realizou-se também a análise por subgrupos de falha de enxertia secundária: perda do enxerto tardia e recuperação autóloga. Não houve associação entre comprimento telomérico do receptor e doador e risco de incidência de perda do enxerto tardia após o transplante. Também não se observou associação do comprimento telomérico do receptor e do doador com risco de incidência de recuperação autóloga após o transplante. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que

avalia o comprimento telomérico no contexto de recuperação autóloga após TMO alogênico para AAG.

Os resultados do presente estudo estão em acordo com o estudo em que 178 pacientes (86% possuíam doença onco-hematológica) realizaram TMO alogênico e a associação entre telômero curto do paciente e recaída da doença também não foi demonstrada¹³⁴.

6.1.4 Avaliação do comprimento telomérico: associação com a toxicidade relacionada ao TMO

A mucosite e a SOS são complicações relacionadas ao condicionamento durante a realização do transplante. Ambas são caracterizadas por agressão tecidual pela quimioterapia com danos ao DNA e aumento do *stress* oxidativo^{116-118,120,124}. Dessa forma, o intuito da avaliação dessas duas complicações relacionadas ao TMO foi avaliar o comprimento telomérico como potencial marcador biológico. No entanto, neste estudo não foi observada associação de mucosite e SOS com o telômero curto do receptor como fator preditor da ocorrência e/ou da gravidade dos eventos, ou telômero longo do receptor como fator protetor contra a ocorrência dos eventos. Do mesmo modo, não houve associação de mucosite e SOS com o telômero curto ou longo do doador. Não há dados na literatura sobre a avaliação de associação entre o comprimento telomérico com mucosite ou SOS. Um único estudo avaliou a associação entre toxicidade e comprimento telomérico no contexto de causas de mortalidade relacionada ao TMO e não obteve significância estatística¹³⁴.

6.1.5 Avaliação do comprimento telomérico: associação com a sobrevida global após o TMO

O TMO com doador relacionado possui probabilidade de SG em torno de 80 a 90%^{73,74}. A importância do telômero curto do paciente como biomarcador de mortalidade relacionada ao TMO alogênico foi demonstrada em 178 pacientes transplantados em sua maioria para doença maligna¹³⁴. Recentemente, outro estudo demonstrou a associação do telômero longo do doador com a maior SG em pacientes que realizaram TMO alogênico não relacionado para AAG¹³⁵.

Em contraste com os estudos prévios, os resultados deste estudo não demonstraram a associação entre o comprimento telomérico do receptor e doador com a SG em pacientes que realizaram TMO alogênico doador relacionado idêntico (n=60), relacionado haploidêntico (n=2) e não relacionado (n=4). Todos os óbitos foram antes de 100 dias do TMO, em decorrência de complicações infecciosas.

A probabilidade de SG dos pacientes com telômero curto do receptor T1 vs T2+T3 foi de 86,4% vs 93,2 % em um ano (p=0,33). A sobrevida média, em dias, no grupo telômero curto foi de 20,82 e no grupo T2 + T3 de 52,77 (p = 0,33). A probabilidade de SG dos receptores com telômero longo do receptor T3 vs T1+T2 foi igual: 90,9% em um ano (p = 0,96). A sobrevida média em dias no grupo T1+T2 foi de 24,21 e no grupo T3, telômero longo, de 52,86 (p = 0,96). A probabilidade de SG dos pacientes com telômero curto do doador T1 vs T2 + T3 foi igual em ambos grupos: 90,9% em um ano (p=0,98). A sobrevida média, em dias, no grupo telômero curto foi de 24,1 e no grupo T2 + T3 de 51,8 (p = 0,98). A probabilidade de SG dos pacientes no grupo telômero longo vs T1+T2 foi igual: 90,9% em um ano (p=0,98). A sobrevida média, em dias, no grupo T1+T2 foi de 28 e no grupo T3, telômero longo, de 52,55 (p=0,98).

Em estudo prévio, o telômero curto do paciente com AAG foi associado com menor sobrevida global e maior recaída da doença durante o tratamento imunossupressor⁴⁰. No entanto, no presente estudo, não houve associação entre menor comprimento telomérico do receptor e doador e menor sobrevida global no contexto de TMO alogênico para AAG em sua maioria com doadores relacionados.

6.2 O uso do método q PCR para avaliação do comprimento telomérico

Por se tratar de um estudo retrospectivo, a análise do comprimento telomérico foi realizada pela técnica do *qPCR* com amostras de DNA, previamente extraídas de leucócitos do PB e armazenadas em freezer a -80°C. Não foi aplicado o método padrão ouro *Southern blot*, pois não havia quantidade de DNA necessária em algumas das amostras e o método *Flow cytometry with fluorescence in situ hybridization (Flow - FISH)*, por se tratar de análise do comprimento telomérico das células de leucócitos, indisponíveis neste estudo.

O comprimento telomérico pode variar de acordo com o tipo de leucócitos do PB¹⁵⁸ e de acordo com a qualidade do DNA¹⁵⁹. Para minimizar a variação do comprimento telomérico, decorrente da qualidade do DNA, todas as amostras foram aplicadas no gel de agarose a 1% e somente as amostras de boa qualidade foram processadas. Como houve variação nas técnicas de extração de DNA intra e inter-centro transplantador, foi observada, durante a análise estatística, diferença no comprimento telomérico entre os centros de TMO do HCRP e do HCPR. Diferenças entre as técnicas de extração podem contribuir para a discrepância entre estudos que avaliam associação entre comprimento telomérico e câncer ou outras doenças^{158,159}.

O método utilizado para extração do DNA influencia na medida do comprimento telomérico. Enquanto o DNA isolado por *salting-out* (*PureGene*) ou extração orgânica (fenol - clorofórmio) produz resultados similares de comprimento telomérico, a extração de DNA, utilizando a técnica de coluna de membrana (*QIAmp*), estima valores menores do comprimento telomérico, conforme demonstrado em um estudo com 44 indivíduos que realizaram a medida do comprimento telomérico pelos três métodos descritos acima¹⁶⁰.

Um estudo com 1033 pacientes com câncer colorretal e 2952 indivíduos controles demonstrou que os métodos de extração fenol - clorofórmio e *salting-out* possuem menos contaminação por proteínas e resultam em DNA de alto peso molecular¹⁵⁹. A técnica de extração de DNA por *QIAmp* possui potencial de corte de DNA maior e pode falhar em encontrar associação, quando a mesma poderia existir, enquanto os estudos que utilizam os métodos fenol - clorofórmio ou *salting-out*, ou outros métodos que não requerem a extração de DNA (como o Q-FISH), podem ser capazes de identificar melhor a associação¹⁵⁹.

No presente estudo, os valores de comprimento telomérico ajustado para a idade do centro de transplante do HCPR foram maiores que os do HCRP. Para que o comprimento telomérico pudesse ser avaliado, foi realizada a padronização dos valores T/S por centro transplantador por meio da fórmula: $T/S \text{ padronizado observado} = (T/S \text{ observado} - \text{média } (T/S \text{ observado do centro})) / \text{desvio-padrão } (T/S \text{ observado do centro})$. Outros fatores como tipo de subgrupo de células dos leucócitos do PB, qualidade do DNA, tempo de estocagem e controle de qualidade da técnica *qPCR* também podem afetar a avaliação do comprimento telomérico.

A avaliação do comprimento telomérico, neste estudo, se deu por meio do método de *qPCR* dos leucócitos total do PB¹⁶¹. No entanto, devido à variação do comprimento

telomérico entre os subgrupos de leucócitos, estudos futuros com um método específico, como *Flow-FISH*, poderia evitar essa limitação¹⁶². Adicionalmente, o comprimento telomérico pelo método *qPCR* pode ser limitado devido a qualidade do DNA¹⁶². Para evitar essa limitação, o presente estudo realizou a avaliação da qualidade do DNA por meio da análise do mesmo em gel de agarose. Os resultados deste estudo, obtidos por *qPCR*, não foram comparados com outro método como o *Southern blot*, porém há estudos demonstrando boa correlação entre os dois métodos^{136,137,163}.

7. Conclusões

-
- A avaliação comparativa entre o comprimento telomérico dos receptores e doadores pré-TMO para AAG demonstrou menor comprimento telomérico nos receptores em todas as faixas etárias, exceto entre 21 e 40 anos, que foi semelhante.
 - Apesar de não haver significância estatística, a enxertia de neutrófilos e plaquetas foi mais tardia nos pacientes que apresentavam telômero curto. Estudos maiores e experimentais poderiam elucidar melhor essa associação no contexto de TMO alogênico para AAG.
 - Não houve associação entre o comprimento telomérico do receptor e doador com a incidência de DECH crônica, falha de enxertia tardia e seus subgrupos: perda do enxerto tardia e recuperação autóloga e toxicidade relacionada ao TMO como mucosite, SOS e SG.
 - O telômero longo do receptor foi associado com menor incidência de DECH aguda GI-II entre os pacientes com AAG que receberam TMO alogênico. Nesta casuística, observou-se a ocorrência de DECH aguda em sete pacientes no total de transplantes (n=66). Seis realizaram TMO com doador relacionado 6x6 e um paciente, com doador não relacionado, seis pacientes receberam fonte de CPH-MO e um recebeu fonte de CPH-SP.
 - Desse modo, este estudo demonstrou que o comprimento telomérico longo do receptor está associado à menor incidência da DECH aguda GI-II nos pacientes que realizaram TMO alogênico para AAG, em sua maioria com doadores relacionados (91% dos transplantes). Não foi possível realizar a avaliação da associação entre telômero e DECH aguda GIII-IV, pois não houve eventos nessa casuística.
 - A DECH aguda permanece como uma das maiores causas de morbi-mortalidade após o TMO alogênico. Assim, estudos clínicos e experimentais são necessários para confirmação do telômero longo do receptor como marcador biológico de prevenção da DECH aguda durante a realização de TMO alogênico para AAG com doadores relacionados ou não relacionados.

-
- Em estudo prévio, o telômero curto do paciente com AAG foi associado com menor sobrevida global e maior recaída da doença durante o tratamento imunossupressor. No entanto, no presente estudo, não houve associação entre menor comprimento telomérico do receptor e doador e menor sobrevida global no contexto de TMO alogênico para AAG em sua maioria com doadores relacionados.
 - Em conclusão, o TMO alogênico relacionado permanece como melhor opção terapêutica para os pacientes jovens com diagnóstico de AAG e presença de telômero curto.

8. Referências Bibliográficas¹

¹De acordo com o estilo Vancouver.

1. Yamaguchi H1, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ et al. Mutations in TERT, the gene of telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2005;352(14):1413-24.
2. Olovnikov AM. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*. 1973;41(1):181-90.
3. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(3):407-25.
4. Stewart SA, Weinberg RA. Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*. 2000; 10(6):399-406.
5. Harrington L. Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer Lett*. 2003;194(2):139-54.
6. Pogacic V, Dragon F, Filipowicz W. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol*. 2000;20(23):9028-40.
7. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 2002;21(4):564-79.
8. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*. 1997;276(5312):561-7.
9. Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*. 2008;111(9):4446-55.
10. Calado RT, Yewdell WT, Wilkerson KL, Kajigaya S, Young NS. Sex hormones up-regulate telomerase activity of normal human hematopoietic cells and restore telomerase activity in carriers of telomerase complex mutations [abstract]. *Blood* 2005;106:641a. Abstract nº 2276.
11. Li H, Zhao L, Yang Z, Funder JW, Liu J-P. Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1998;273:33436-42.

12. Bayne S, Liu J-P. Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;240(1-2):11-22.
13. Li H, Zhao LL, Funder JW, Liu J-P. Protein phosphatase A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1997;272(27):16729-32.
14. Leteurtre F, Li X, Guardiola P, Le Roux G, Sergère JC, Richard P et al. Accelerated telomerase shortening and telomerase activation in Fanconi's anemia. *Br J Haematol*. 1999;105(4):883-93.
15. Li X, Leteurtre F, Rocha V, Guardiola P, Berger R, Daniel MT et al. Abnormal telomere metabolism in Fanconi's anaemia correlates with genomic instability and the probability of developing severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2003;120(5):836-45.
16. Thornley I, Dror Y, Sung L, Wynn RF, Freedman MH. Abnormal telomere shortening in leucocytes of children with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol*. 2002;117(1):189-92.
17. Sheinberg P. Prognostic value of telomere attrition in patients with aplastic anemia. *Int. J. Hematol*. 2013;97(5):553-7.
18. Vulliamy TJ, Knight SW, Mason PJ, Dokal I. Very short telomeres in the peripheral blood of patients with x-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27(2):353-7.
19. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med* 2009;361(24):2353-65.
20. Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood*. 1998;91(10):3582-92.
21. Brümmendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, Young NS, Lansdorp PM. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood*. 2001;97(4):895-900.
22. Calado RT. Telomeres and marrow failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:338-43.

23. Fogarty PF1, Yamaguchi H, Wiestner A, Baerlocher GM, Sloand E, Zeng WS et al. Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. *Lancet*. 2003 Nov 15;362(9396):1628-30.
24. Calado RT, Graf AS, Wilkerson KL, Kajigaya S, Ancliff PJ, Dror Y et al. Mutations in SBDS gene in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007;110(4):1141-6.
25. Yamaguchi H1, Baerlocher GM, Lansdorp PM, Chanock SJ, Nunez O, Sloand E et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2003;102(3):916-8.
26. Calado RT, Pintao MC, Silva WA, Falcao RP, Zago MA. Aplastic anaemia and telomerase RNA mutations. *Lancet* 2002;360(9345):1608.
27. Chakraborty S1, Sun CL, Francisco L, Sabado M, Li L, Chang KL et al. Accelerated telomere shortening precedes development of therapy related myelodysplasia or acute myelogenous leukemia after autologous transplantation for lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 10;27(5):791-8.
28. Dolberg JO, Levyb Y. Idiopathic aplastic anemia: Diagnosis and classification. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):569-73.
29. Pitcher LA, Hann IM, Evans JP, Veys P, Chessells JM, Webb DK. Improved prognosis for acquired aplastic anaemia. *Arch Dis Child*. 1999;80(2):158-62.
30. Bacigalupo A, Passweg J. Diagnosis and treatment of acquired aplastic anemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(2):159-70..
31. Camitta BM, Storb R, Thomas ED. Aplastic anemia (first of two parts): pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. *N Engl J Med*. 1982;306(11):645-52.
32. Young NS, Alter BP. Epidemiology of acquired aplastic anemia. In: Young NS, Alter Bp, eds. *Aplastic anemia acquired and inherited*. Philadelphia: WB Saunders. 1994, p. 24-31.
33. Young NS, Goh AS, Rahman M, Menon J, Purushothaman V. Epidemiology of aplastic anaemia in the state of Sabah, Malaysia. *Med J Malaysia* 1998;53(1):59-62.

34. Mary JY, Baumelou E, Guiguet M. Epidemiology of aplastic anemia in France: a prospective multicentric study. The French Cooperative Group for Epidemiological Study of Aplastic Anemia. *Blood*. 1990;75(8):1646-53.
35. Kojima S. Aplastic anemia in the Orient. *Int J Hematol*. 2002;76 (suppl2):173-4.
36. Maluf EM, Pasquini R, Eluf JN, Kelly J, Kaufman DW. Aplastic anemia in Brazil: incidence and risk factors. *Am J Hematol*. 2002;71(4):268-74.
37. Kaufman D, Kelly J, Shapiro S. The drug etiology of agranulocytosis and aplastic anemia. New York: Oxford University Press. 1991; 259.
38. Aoki K, Fujiki N, Shimizu H, Ohno Y. Geographic and ethnic differences of aplastic anemia in humans. In: Najean Y (ed.). *Medullary aplasia*, vol. 79. New York: Masson; 1980.
39. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*. 2006;108(8):2509-19.
40. Scheinberg P, Cooper JN, Sloand EM, Wu CO, Calado RT, Young NS. Association of Telomere Length of Peripheral Blood Leukocytes with Hematopoietic Relapse, Malignant Transformation, and Survival in Severe Aplastic Anemia. *JAMA*. 2010;305(12):1358-64.
41. Risitano AM, Maciejewski JP, Green S, Plasilova M, Zeng W, Young NS. In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing. *Lancet*. 2004;364(9431):355-64.
42. Solomou EE, Keyvanfar K, Young NS. T-bet, a Th1 transcription factor, is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia. *Blood*. 2006;107(10):3983-91.
43. Young NS, Scheinberg P, Calado RT. Aplastic Anemia. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(3):162-8.
44. Nisticò A, Young NS. Gamma-Interferon gene expression in the bone marrow of patients with AA. *Ann Intern Med*. 1994;120(6):463.

-
45. Shi J, Ge M, Lu S, Li X, Shao Y, Huang J et al. Intrinsic impairment of CD4+CD25+ regulatory T cells in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012;120(8):1624-32.
 46. Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, Koskela H, Leblanc F, Peng Ng K et al. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012;120(15):3048-57.
 47. Goto M, Kuribayashi K, Takahashi Y, Kondoh T, Tanaka M, Kobayashi D et al. Identification of autoantibodies expressed in acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2013;60(3):359-62.
 48. Philpott NJ, Scopes J, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Gibson FM. Increased apoptosis in AA bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance. *Exp Hematol*. 1995;23(14):1642-8.
 49. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Anderson S, Young NS. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 1995;91(1):245-52.
 50. Bruin AM, Demirel O, Hooibrink B, Brandts CH, Nolte MA. Interferon-gamma impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood*. 2013;121(18):3578-85.
 51. Walne AJ, Dokal A, Plagnol V, Beswick R, Kirwan M, de la Fuente J et al. Exome sequencing identifies MPL as a causative gene in familial aplastic anemia. *Haematologica*. 2012;97(4):524-8.
 52. Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012;120(6):1185-96.
 53. Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O, Young NS. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome. *JAMA*. 2003;289(9):1130-5.
 54. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. Long-term outcome of pediatric patients with severe aplastic anemia treated with antithymocyte globulin and cyclosporine. *J Pediatr*. 2008;153(6):814-9.

-
55. Huang IA, Jaing TH, Yang CP, Hung IJ, Tsay PK, Luo CC et al. Single-Center Experience: immunosuppressive therapy as frontline treatment for 33 children with acquired severe aplastic anemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2009;26(7):487-95.
 56. Führer M, Rampf U, Baumann I, Faldum A, Niemeyer C, Janka-Schaub G et al. Immunosuppressive therapy for aplastic anemia in children: a more severe disease predicts better survival. *Blood*. 2005;106(6):2102-4.
 57. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2009;144(2):206-16.
 58. Tichelli A, Schrezenmeier H, Socié G, Marsh J, Bacigalupo A, Dührsen U et al. A randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia receiving antithymocyte globulin (ATG), cyclosporine, with or without G-CSF: a study of the SAA Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2011;117(17):4434-41.
 59. Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Biancotto A, Wu CO et al. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2011;365(5):430-8.
 60. Scheinberg P, Nunez O, Young NS. Retreatment with rabbit anti-thymocyte globulin and ciclosporin for patients with relapsed or refractory severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2006;133(6):622-7.
 61. Di Bona E, Rodeghiero F, Bruno B, Gabbas A, Foa P, Locasciulli A et al. Rabbit antithymocyte globulin (r-ATG) plus cyclosporine and granulocyte colony stimulating factor is an effective treatment for aplastic anaemia patients unresponsive to a first course of intensive immunosuppressive therapy. Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Br J Haematol*. 1999;107(2):330-4.
 62. Scheinberg P, Nunez O, Wu C, Young NS. Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: antithymocyte globulin, ciclosporin and mycophenolate mofetil. *Br J Haematol*. 2006;133(6):606-11.
 63. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Boss C, Sloand EM, Young NS. Treatment of severe aplastic anemia with a combination of horse antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without sirolimus: a prospective randomized study. *Haematologica*. 2009;94(3):348-54.

-
64. Georges GE, Storb R. Hematopoietic cell transplantation for aplastic anemia. In: Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG. (Eds). *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 4º Ed. Wiley-Blackwell, 2008, cap. 49, p. 707-26.
 65. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, Bacigalupo A, Bredeson CN, Bullorsky E et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007;110(4):1397-400.
 66. Marsh JC, Ball SE, Cavenagh J, Darbyshire P, Dokal I, Gordon-Smith EC, Keidan J et al. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2009;147(1):43-70.
 67. Storb R, Leisenring W, Anasetti C, Appelbaum FR, Buckner CD, Bensinger WI et al. Long-term follow-up of allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia conditioned by cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin. *Blood*. 1997;89(10):3890-1.
 68. Halter J, Kadera Y, Ispizua AU, Greinix HT, Schmitz N, Favre G et al. Severe events in donors after allogeneic hematopoietic stem cell donation. *Haematologica* 2009;94(1):94-101.
 69. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2012;367(16):1487-96.
 70. Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, Matos AV, Storer B, Bensinger WI et al. Comparison of chronic graft-versus host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood*. 2002;100(2):415-9.
 71. Seth T, Kanga U, Sood P, Sharma V, Mishra P, Mahapatra M. Audit of peripheral stem cell transplantation for aplastic anemia in multitransfused infected patients. *Transplant Proc*. 2012;44(4):922-4.
 72. Bacigalupo A, Socié G, Schrezenmeier H, Tichelli A, Locasciulli A, Fuehrer M et al, Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (WPSAA-EBMT). Bone marrow versus peripheral blood as the stem cell source for sibling transplants in acquired aplastic anemia: survival advantage for bone marrow in all age groups. *Haematologica* 2012;97(8):1142-8.

-
73. Chu R, Brazauskas R, Kan F, Bashey A, Bredeson C, Camitta B et al. Comparison of outcomes after transplantation of G-CSF-stimulated bone marrow grafts versus bone marrow or peripheral blood grafts from HLA-matched sibling donors for patients with severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(7):1018-24.
 74. Bacigalupo A. Bone Marrow Transplantation for Acquired Severe Aplastic Anemia. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2014;28(6):1145-55.
 75. Aljurf M, Al-Zahrani H, Van Lint MT, Passweg JR. Standard treatment of acquired severe aplastic anemia, in adult patients 18-40 years old, with an HLA identical sibling. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(2):178-9.
 76. Socié G, Henry-Amar M, Bacigalupo A, Hovs J, Tichelli A, Ljungman P et al. Malignant tumors occurring after treatment of aplastic anemia. *N Engl J Med*. 1993;329(16):1152-7.
 77. Hinterberger-Fischer M, Kier P, Kalhs P, Marosi C, Geissler K, Schwarzingen I et al. Fertility, pregnancies and offspring complications after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1991;7(1):5-9.
 78. Al-Zahrani H1, Nassar A, Al-Mohareb F, Al-Sharif F, Mohamed S, Al-Anazi K et al. Fludarabine-based conditioning chemotherapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acquired severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(5):717-22.
 79. George B, Mathews V, Viswabandya A, Kavitha ML, Srivastava A, Chandy M. Fludarabine and cyclophosphamide based reduced intensity conditioning (RIC) regimens reduce rejection and improve outcome in Indian patients undergoing allogeneic stem cell transplantation or severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(1):13-8.
 80. Maury S, Aljurf M. Management of adult patients older than 40 years refractory to at least one immunosuppressive course: HLA-identical sibling HSCT using fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(2):196-7.
 81. Srinivasan R, Takahashi Y, McCoy JP, Espinoza-Delgado I, Dorrance C, Igarashi T et al. Overcoming graft rejection in heavily transfused and allo-immunised patients with bone marrow failure syndromes using fludarabine-based haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2006;133(3):305-14.

-
82. Maury S, Bacigalupo A, Anderlini P, Aljurf M, Marsh J, Socié G et al. Severe Aplastic Anemia Working Party, European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT-SAAWP). Improved outcome of patients older than 30 years receiving HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for severe acquired aplastic anemia using fludarabine-based conditioning: a comparison with conventional conditioning regimen. *Haematologica*. 2009;94(9):1312-5.
 83. Inamoto Y, Suzuki R, Kuwatsuka Y, Yasuda T, Takahashi T, Tsujimura A et al. Long-term outcome after bone marrow transplantation for aplastic anemia using cyclophosphamide and total lymphoid irradiation as conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(1):43-9.
 84. Champlin RE, Perez WS, Passweg JR, Klein JP, Camitta BM, Gluckman E et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: a randomized controlled study of conditioning regimens. *Blood*. 2007;109(10):4582-5.
 85. Marsh JC, Pearce RM, Koh MB, Lim Z, Pagliuca A, Mufti GJ et al. Retrospective study of alemtuzumab vs ATG-based conditioning without irradiation for unrelated and matched sibling donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a study from the British Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(1):42-8.
 86. Eapen M, Le Rademacher J, Antin JH, Champlin RE, Carreras J, Fay J et al. Effect of stem cell source on outcomes after unrelated donor transplantation in severe aplastic anemia. *Blood*. 2011;118(9):2618-21.
 87. Deeg HJ, Amylon ID, Harris RE, Collins R, Beatty PG, Feig S et al. Marrow transplants from unrelated donors for patients with aplastic anemia: minimum effective dose of total body irradiation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(4):208-15.
 88. Kojima S, Matsuyama T, Kato S, Kigasawa H, Kobayashi R, Kikuta A et al. Outcome of 154 patients with severe aplastic anemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program. *Blood*. 2002;100(3):799-803.
 89. Perez-Albuerne ED1, Eapen M, Klein J, Gross TJ, Lipton JM, Baker KS et al. Outcome of unrelated donor stem cell transplantation for children with severe aplastic anemia. *Br J Haematol*. 2008;141(2):216-23.
 90. Bacigalupo A, Socie' G, Lanino E, Prete A, Locatelli F, Locasciulli A, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, antithymocyte globulin, with or without low dose

- total body irradiation, for alternative donor transplants, in acquired severe aplastic anemia: a retrospective study from the EBMT-SAA Working Party. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18(7):1007-11.
91. Tolar J, Deeg HJ, Arai S, Horwitz M, Antin JH, McCarty JM et al. Fludarabine-based conditioning for marrow transplantation from unrelated donors in severe aplastic anemia: early results of a cyclophosphamide dose deescalation study show life-threatening adverse events at predefined cyclophosphamide dose levels. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(7):1007-11.
 92. Peffault de la Tour R, Rocha V, Socie G. Cord blood transplants in aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(2):201-2.
 93. Ciceri F, Lupo Stanghellini MT, Korthof E. Haploidentical transplantation in patients with acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(2):183-5.
 94. Li XH, Gao CJ, Da WM, Cao YB, Wang ZH, Xu LX et al. Reduced intensity conditioning, combined transplantation of haploidentical hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells in patients with severe aplastic anemia. *PLoS One*. 2014;9(3):e89666.
 95. Gao L, Li Y, Zhang Y, Chen X, Gao L, Zhang C et al. Long-term outcome of HLA-haploidentical hematopoietic SCT without in vitro T-cell depletion for adult severe aplastic anemia after modified conditioning and supportive therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(4):519-24.
 96. Clay J, Kulasekararaj AG, Potter V, Grimaldi F, McLornan D, Raj K et al. Nonmyeloablative peripheral blood haploidentical stem cell transplantation for refractory severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(11):1711-6.
 97. Lawler M, McCann SR, Marsh JC, Ljungman P, Hows J, Vandenberghe E et al. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA. *Br J Haematol*. 2009;144(6):933-45.
 98. Piccin A, McCann S, Socié G, Oneto R, Bacigalupo A, Lcasciulli A et al. Survival of patients with documented autologous recovery after SCT for severe aplastic anemia: a study by the WPSAA of the EBMT. *Bone Marrow Transplantation*. 2010;45(6):1008-13.

-
99. Apperley J, Masszi T. Graft-versus-host disease. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T. (eds.). *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, 6ª Ed. 2012, cap. 13, p. 216-33.
 100. Pavletic SZ, Vogelsang GB. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestations and therapy. In: Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG. (Eds). *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 4º Ed. Wiley-Blackwell, 2008, cap. 87, p. 1304-24.
 101. Cutler C, Antin JH. Manifestation and treatment of acute graft-versus-host disease: clinical manifestations and therapy. In: Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG. (Eds). *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 4º Ed. Wiley-Blackwell, 2008, cap. 86, p. 1287-303.
 102. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(12):945-56.
 103. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15(6):825-8.
 104. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol*. 1997;97(4):855-64.
 105. Couriel DR, Saliba R, Escalón MP, Hsu Y, Ghosh S, Ippoliti C et al. Sirolimus in combination with tacrolimus and corticosteroids for the treatment of resistant chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2005;130(3):409-17.
 106. Jagasia M, Giglia J, Chinratanalab W, Dixon S, Chen H, Frangoul H et al. Incidence and outcome of chronic graft-versus-host disease using National Institutes of Health consensus criteria. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(10):1207-15.
 107. Pidala J, Vogelsang G, Martin P, Chai X, Storer B, Pavletic S et al. Overlap subtype of chronic graft-versus-host disease is associated with an adverse prognosis, functional impairment, and inferior patient-reported outcomes: a Chronic Graft-versus-Host Disease Consortium study. *Haematologica*. 2012;97(3):451-8.

-
108. Kuzmina Z, Eder S, Böhm A, Pernicka E, Vormittag L, Kalhs P et al. Significantly worse survival of patients with NIH-defined chronic graft-versus-host disease and thrombocytopenia or progressive onset type: results of a prospective study. *Leukemia*. 2012;26 (4):746-56.
 109. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*. 1980;69(2):204-17.
 110. Arai S, Jagasia M, Storer B, Chai X, Pidala J, Cutler C et al. Global and organ-specific chronic graft-versus-host disease severity according to the 2005 NIH Consensus Criteria. *Blood*. 2011;118(15):4242-9.
 111. Grkovic L, Baird K, Steinberg SM, Williams KM, Pulanic D, Cowen EW et al. Clinical laboratory markers of inflammation as determinants of chronic graft-versus-host disease activity and NIH global severity. *Leukemia*. 2012;26(4):633-43.
 112. Haverman TM, Raber-Durlacher JE2, Rademacher WM1, Vokurka S3, Epstein JB4, Huisman C et al. Oral complications in hematopoietic stem cell recipients: the role of inflammation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:ID378281.
 113. Bellm LA, Epstein JB, Rose-Ped A, Martin P, Fuchs HJ. Patient reports of complications of bone marrow transplantation. *Support Care Cancer*. 2000;8(1):33-9.
 114. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277-84.
 115. Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury: a complex 'wound'. *Radiother Oncol*. 2002;63(2):129-45.
 116. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004;100(Suppl. 9):1995-2025.
 117. Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer*. 2013;21(7):2075-83.
 118. Yeoh ASJ, Bowen JM, Gibson RJ, Keefe DMK. Nuclear factor κ B (NF κ B) and cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the irradiated colorectum is associated with

- subsequent histopathological changes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(5):1295-303.
119. Yeoh A, Gibson R, Yeoh E, Bowen J, Stringer A, Giam K et al. Radiation therapy induced mucositis: relationships between fractionated radiation, NF- κ B, COX-1, and COX-2. *Cancer Treat Rev.* 2006;32(8):645-51.
120. Shulman HM, McDonald GB, Matthews D, Doney KC, Kopecky KJ, Gauvreau JM et al. An analysis of hepatic veno-occlusive disease and centrilobular hepatic degeneration following bone marrow transplantation. *Gastroenterology.* 1980;79(6):1178-91.
121. McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman HM, Thomas ED. Veno-occlusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence and predisposing factors. *Hepatology.* 1984;4(1):116-22.
122. Jones RJ, Lee KS, Beschoner WE, Vogel VG, Grochow LB, Braine HG et al. Veno-occlusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation.* 1987;44(6):778-83.
123. Kim H, Lee KH, Sohn SK, Jung CW, Joo YD, Kim SH et al. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with idiopathic aplastic anemia. *Leuk Res.* 2013;37(10):1241-7.
124. Fan CQ, Crawford JM. Sinusoidal obstruction syndrome. *J Clin Exp Hepatology.* 2014;4(4):332-46.
125. Gadalla SM, Savage SA. Telomere biology in hematopoiesis and stem cell transplantation. *Blood Rev.* 2011;25(6):261-9.
126. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M et al. Reduced Mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *N Engl J Med.* 2010;363(22):2091-101.
127. Sorrow ML. Comorbidities and hematopoietic cell transplantation outcomes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:237-47.
128. Kanda J, Mizumoto C, Ichinohe T, Kawabata H, Saito T, Yamashita K et al. Pretransplant serum ferritin and C-reactive protein as predictive factors for early

- bacterial infection after allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(2):208-16.
129. Armand P, Kim HT, Cutler CS, Ho VT, Koreth J, Alyea EP et al. Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood.* 2007;109(10):4586-8.
130. Baerlocher GM, Rovó A, Müller A, Matthey S, Stern M, Halter J et al. Cellular senescence of white blood cells in very long-term survivors after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the role of chronic graft-versus-host disease and female donor sex. *Blood.* 2009;114(1):219-22.
131. Akiyama M, Asai O, Kuraishi Y, Urashima M, Hoshi Y, Sakamaki H et al. Shortening of telomeres in recipients of both autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25(4):441-7.
132. Akiyama M, Hoshi Y, Sakurai S, Yamada H, Yamada O, Mizoguchi H. Changes of telomere length in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21(2):167-71.
133. Lee J, Kook H, Chung I, et al. Telomere length changes in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24 (4): 411-415.
134. Peffault de Latour R, Calado RT, Busson M, Abrams J, Adoui N, Robin M et al. Age-adjusted recipient pretransplantation telomere length and treatment-related mortality after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2012;120(16):3353-9.
135. Gadalla SM, Wang T, Haagensohn M, Spellman SR, Lee SJ, Williams KM et al. Association between donor leukocyte telomere length and survival after unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation for severe aplastic anemia. *JAMA.* 2015;313(6):594-602.
136. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47.
137. Gutierrez-Rodriguez F, Santana-Lemos BA, Scheucher OS, Alves-Paiva RM, Calado RT. Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans. *Plos One.* 2014;11(9):e113747.

-
138. Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc.* 1999;94:496-509.
139. Hosmer D, Lemeshow S. *Applied logistic regression (Second Edition)*. New York: John Wiley & Sons, Inc. SAS system for Windows. 2000; Release 9.2. SAS Inst., Cary, NC. 201.
140. Lincz LF, Scorgie FE, Sakoff JA, Fagan KA, Ackland SP, Enno A. Telomere length predicts neutrophil recovery in the absence of G-CSF after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34(5):439-45.
141. Widmann TA, Willmann B, Pfreundschuh M, Beelen DW. Influence of telomere length on short-term recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2005;33(10):1257-61.
142. Ju Z, Jiang H, Jaworski M, Rathinam C, Gompf A, Klein C et al. Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment, *Nature medicine* 2007;13(6):742-7.
143. Lieber MR, Karanjawala ZE. Aging, repetitive genomes and DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5(1):69-75.
144. d'Adda di Fagagna, F. et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003;426(6963):194-8.
145. Vaziri H, Benchimol S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* 1996;31(1-2):295-301.
146. Gadalla SM, Cawthon R, Giri N, Alter BP, Savage SA. Telomere length in blood, buccal cells, and fibroblasts from patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Aging (Albany NY).* 2010;2(11):867-74.
147. Mangerini R, Lanino E, Terranova P, Faraci M, Pistillo MP, Gaetani GF et al. Telomere length of donors influences granulocyte recovery in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* 2009;88(10):1029-31.

-
148. Bacigalupo A, Socié G, Hamladji RM, Aljurf M, Maschan A, Kyrzcz-Krzemien S et al. Current outcome of HLA identical sibling versus unrelated donor transplants in severe aplastic anemia: an EBMT analysis. *Haematologica*. 2015;100(5):696-702.
 149. Ball LM, Egeler RM. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41 Suppl 2:S58-64.
 150. Palmer J, Azevedo W, Voltarelli JC, Chao N. Doença do enxerto- contra hospedeiro aguda. In: *Transplante de células tronco hematopoéticas*. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2009, cap 30, p 677-91.
 151. Chao NJ, Chen BJ. Prophylaxis and Treatment of Acute Graft-Versus- Host Disease. *Semin Hematol*. 2006;43(1):32-41.
 152. Yi T, Chen Y, Wang L, Du G, Huang D, Zhao D et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2 and Th17 cells in graft versus host disease. *Blood*. 2009;114(14):3101-12.
 153. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor type CD4+CD25+ T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med*. 2002;196(3):389-99.
 154. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft versus host disease lethality. *Blood*. 2002;99(10):3493-9.
 155. Sashida G, Ohyashiki JH, Kubota N, Shoji N, Ishii Y, Tauchi T et al. Marked telomere fluctuation of leukocytes during graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation. *Int J Mol Med*. 2005;16(5):883-8.
 156. Kawano Y, Kim HT, Matsuoka K, Bascug G, McDonough S, Ho VT et al. Low telomerase activity in CD4 regulatory T cells in patients with severe chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011;118(18):5021-30.
 157. Awaya N, Baerlocher GM, Manley TJ, Sanders JE, Mielcarek M, Torok-Storb B, et al. Telomere shortening in hematopoietic stem cell transplantation: a potential mechanism for late graft failure? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(11):597-600.

-
158. Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, Savage SA. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(6):1238-50.
 159. Cunningham JM, Johnson RA, Litzelman K, Skinner HG, Seo S, Engelman CD et al. Telomere Length Varies By DNA Extraction Method: Implications for Epidemiologic Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(11):2047-54.
 160. Olsen MT1, Bérubé M, Robbins J, Palsbøll PJ. Empirical evaluation of humpback whale telomere length estimates; quality control and factors causing variability in the singleplex and multiplex qPCR methods. *BMC Genet.* 2012;13:77.
 161. Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS Genet.* 2012;8(5):e1002696.
 162. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res.* 2012;730(1-2):59-67.
 163. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e21.

9. Apêndices

APÊNDICE A

AMOSTRAS DE DNA EM GRUPOS DE RECEPTOR E DOADOR DE MO EM GEL DE AGAROSE 1% DA UNIDADE DE TMO HCRP E HCPR.

Figura 1: Amostras de DNA em grupos de receptor e doador de MO em gel de agarose 1% da Unidade de TMO HC-FMRP-USP. As amostras de DNA estão apresentadas em grupos de receptor e doador de 1 a 72. **(A-D)** Os retângulos representam amostras DNA receptor e doador de medula óssea para anemia aplástica grave. Os círculos indicam os pares de DNA receptor e doador de medula óssea para anemia aplástica grave com boa qualidade para a realização do *qPCR*. E as setas indicam amostras de receptores que foram realizados *qPCR*.

**AMOSTRAS DE DNA EM GRUPOS DE RECEPTOR E DOADOR DE MO EM
GEL DE AGAROSE 1% DA UNIDADE DE TMO HCRP E HCPR.**

Figura 2: Amostras de DNA em grupos de receptor e doador de MO em gel de agarose 1% da Unidade de TMO HC-FMRP-USP. As amostras de DNA estão apresentadas em grupos de receptor e doador de 73 a 97. **(E-F)** Os retângulos representam os pares de DNA receptor e doador de medula óssea para anemia aplástica grave. Os círculos indicam os pares de DNA receptor e doador de medula óssea para anemia aplástica grave com boa qualidade para a realização do *qPCR*.

**AMOSTRAS DE DNA EM GRUPOS DE RECEPTOR E DOADOR DE MO EM
GEL DE AGAROSE 1% DA UNIDADE DE TMO HCRP E HCPR.**

Figura 3: Amostras de DNA em grupos de receptor e doador de MO em gel de agarose 1% da Unidade de TMO HC-UFPR. As amostras de DNA estão apresentadas em pares de receptor e doador de 1 a 80. (A-D) Os retângulos representam os pares de DNA receptor e doador de medula óssea para anemia aplástica grave. Os círculos indicam os pares de DNA receptor e doador de medula óssea para anemia aplástica grave com boa qualidade para a realização do *qPCR*.

**AMOSTRAS DE DNA EM GRUPOS DE RECEPTOR E DOADOR DE MO EM
GEL DE AGAROSE 1% DA UNIDADE DE TMO HCRP E HCPR.**

Figura 4: Amostras de DNA em grupos de receptor e doador de MO em gel de agarose 1% da Unidade de TMO HC-UFPR. As amostras de DNA estão apresentadas em pares de receptor e doador de 81 a 136. **(E-G)** Os retângulos representam os pares de DNA receptor e doador de medula óssea para anemia aplástica grave. Os círculos indicam os pares de DNA receptor e doador de medula óssea para anemia aplástica grave com boa qualidade para a realização do *qPCR*.

APÊNDICE B

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO COMPRIMENTO TELOMÉRICO DO DOADOR E RECEPTOR COM OS DESFECHOS CLÍNICOS PELA CURVA ROC

1) T/S doador padronizado ajustado - Falha de enxertia

Area under the ROC curve (AUC)	0,641326
Standard Error ^a	0,0927
95% Confidence interval ^b	0,513802 to 0,755719
z statistic	1,525
Significance level P (Area=0.5)	0,1272

^aDeLong et al., 1988; ^bBinomial exact.

Valor T/S doador <0,0275 grupo T1 + T2

Gráfico 1: Curva roc para valores T/S doador padronizado ajustado e falha de enxertia tardia.

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO COMPRIMENTO TELOMÉRICO DO DOADOR E RECEPTOR COM OS DESFECHOS CLÍNICOS PELA CURVA ROC

2) T/S doador padronizado ajustado - DECH aguda

Area under the ROC curve (AUC)	0,641646
Standard Error ^a	0,126
95% Confidence interval ^b	0,514130 to 0,756003
z statistic	1,124
Significance level P (Area=0.5)	0,2612

^aDeLong et al., 1988; ^bBinomial exact

Valor T/S doador $\leq -0,8016$ grupo T1

Gráfico 2: Curva roc para valores T/S doador padronizado ajustado e DECH aguda.

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO COMPRIMENTO TELOMÉRICO DO DOADOR E RECEPTOR COM OS DESFECHOS CLÍNICOS PELA CURVA ROC

3) T/S receptor padronizado ajustado - DECH aguda.

Area under the ROC curve (AUC)	0,656174
Standard Error ^a	0,0772
95% Confidence interval ^b	0,529030 to 0,768799
z statistic	2,023
Significance level P (Area=0.5)	0,0431

^aDeLong et al., 1988; ^bBinomial exact

Valor T/S receptor $\leq 0,0213$ grupo T1+T2

Gráfico 3: Curva roc para valores T/S receptor padronizado ajustado e DECH aguda.

APÊNDICE C

CASUÍSTICA DOS PACIENTES COM DECH AGUDA APÓS TMO ALOGÊNICO PARA ANEMIA APLÁSTICA

Tabela 1: Casuística dos pacientes com DECH aguda após TMO alogênico para anemia aplástica.

<i>Paciente</i>	<i>Grau</i>	<i>Idade doador / receptor</i>	<i>Sexo doador / receptor</i>	<i>Tipo Doador e HLA</i>	<i>Fonte CPH</i>	<i>Nº CN ou CD34+/kg</i>	<i>Condicionamento</i>	<i>Profilaxia DECH</i>
1	I	22/19	M/M	Rel 6x6	MO	4,7x10 ⁸	CY	CSA+MTX
2	I	34/38	M/M	Rel 6x6	MO	6,5x10 ⁸	CY	CSA+MTX
3	I	17/26	F/F	Rel 6x6	MO	6,8 x10 ⁸	CY	CSA+MTX
4	I	36/32	F/M	Rel 6x6	MO	4,2 x10 ⁸	CY	CSA+MTX
5	I	28/41	M/M	Não rel 10x10	MO	2,8 x10 ⁸	FLUCY+TBI	CSA+MMF
6	II	22/21	M/M	Rel 6x6	SP	3,5 x10 ⁶	CY+ATG	CSA+MTX
7	II	24/17	M/F	Rel 6x6	MO	2,8 x10 ⁸	CY	CSA+MTX

M: masculino; **F:** feminino, **HLA:** Antígeno Leucocitário Humano; **Rel:** doador relacionado; **CPH-SP:** Células Progenitoras Hematopoéticas; **MO:** Medula Óssea; **CN:** Células Nucleadas; **CD34+:** glicoproteína transmembrana expressa em células progenitoras hematopoéticas; **CY:** Ciclofosfamida IV 200mg/kg; **CY+ATG:** Ciclofosfamida IV 200mg/kg + globulina antitímócito IV 4,5mg/kg; **FLU+CY+TBI:** Fludarabina IV 150mg/m²; CY IV 120mg/kg e Irradiação corporal total 2Gy; **DECH:** doença do enxerto contra o hospedeiro; **CSA:** ciclosporina IV 3mg/kg; **MTX:** Metotrexate IV 15mg/m² D+1 e 10mg/m² D+3; D+6, D+11; **MMF:** Micofenolato mofetil.

<i>Paciente</i>	<i>Tertil T/S Receptor</i>	<i>Tertil T/S Doador</i>	<i>VNTR</i>
1	1	3	-
2	2	1	100% doador
3	2	1	-
4	2	1	-
5	2	1	100% doador
6	2	3	100% doador
7	1	2	100% doador

T/S: comprimento telomérico, **VNTR:** Variable Number Tandem Repeat.