PHILLIP SCHEINBERG

Parâmetros preditivos de resposta hematológica, recidiva, evolução clonal e sobrevida em pacientes com anemia aplástica severa tratados com terapia imunossupressora

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Scheinberg, Phillip

Parâmetros preditivos de resposta hematológica, recidiva, evolução clonal e sobrevida em pacientes com anemia aplástica severa tratados com terapia imunossupressora / Phillip Scheinberg. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Descritores: 1.Anemia aplástica 2.Pancitopenia 3.Soro antilinfocitário
4.Telômero 5.Imunossupressores 6.Sobrevida 7.Evolução clonal 8.Prognóstico

USP/FM/DBD-022/16

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer o apoio, persistência, companheirismo da minha esposa Priscila que foi imprescindível no sucesso de minhas aventuras científicas.

Aos meus pais e família, que me apoiam incondicionalmente nas aspirações esportivas, profissionais e científicas.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

“If we know what we were doing, it wouldn’t be called research, would it?”

Albert Einstein

“Medicine is a science of uncertainty and an art of probability”

William Osler

SUMÁRIO

Lista de símbolos	
Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Summary	

1. Considerações Gerais

1.1. Apresentação clínica.....	1
1.2. Fisiopatogenia.....	4
1.3. Terapias imunossupressora e transplante de medula óssea.....	5

2. Estudo “Resultados a longo termo de pacientes pediátricos com anemia aplástica severa tratados com globulina antitimocítica”

2.1. Introdução.....	10
2.2. Objetivos.....	11
2.3. Materiais e Métodos.....	11
2.3.1. Regimes imunossupressores.....	13
2.3.2. Métodos estatísticos.....	14
2.4. Resultados.....	15
2.5. Discussão.....	22

3. Estudo “Fatores preditivos de resposta à imunossupressão e sobrevida em anemia aplástica severa”

3.1. Introdução	24
3.2. Objetivos.	25
3.3. Materiais e Métodos.....	25
3.3.1. Métodos estatísticos.....	27

3.4. Resultados.....	28
3.5. Discussão.....	41
4. Estudo “Associação do comprimento telomérico em leucócitos mononucleares com recidiva hematológica, transformação maligna e sobrevida na anemia aplástica severa”	
4.1. Introdução.....	45
4.2. Objetivo.....	47
4.3. Materiais e Métodos.....	47
4.3.1. Métodos estatísticos.....	49
4.4. Resultados.....	50
4.5. Discussão.....	59
5. Conclusões.....	63
6. Referências.....	65

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μL	Microlitro
mg	Miligramma
g	Gramas
dL	Decilitro
kg	Quilograma
ng	Nanograma
ml	Mililitro
m^2	Metro quadrado
>	Maior que
<	Menor
$\geq$	Maior ou igual que
β	Beta

LISTA DE ABREVIATURAS

HLA	“Human leukocyte antigen”
CD	“Clusters of differentiation”
EUA	Estados Unidos da América
NIH	National Institutes of Health
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
Inc.	Incorporado
vs.	Versus
Fig.	Figura

LISTA DE TABELAS

1. Estudo “Resultados a longo termo de pacientes pediátricos com anemia aplástica severa tratados com globulina antitimocítica”	
1.1. Tabela 1 – Características dos pacientes.....	16
2. Estudo “Fatores preditivos de resposta à imunossupressão e sobrevida em anemia aplástica severa”	
2.1. Tabela 2 – Característica dos pacientes.....	29
2.2. Tabela 3 - Regressão logística uni- e multivariada de fatores de risco continuou com resposta hematológica aos 6 meses.....	31
2.3. Tabela 4 - Análise univariada da taxa de resposta aos 6 meses.....	33
2.4. Tabela 5 - Análise multivariada da taxa de reposta aos 6 meses.....	35
2.5. Tabela 6 – Regressão logística uni- e multivariada de parâmetros do hemograma com sobrevida nos 6 primeiros meses após imunossupressão.....	37
2.6. Tabela 7 - Regressão logística uni- e multivariada de parâmetros do hemograma com resposta hematológica em adultos.....	37
3. Estudo “Associação do comprimento telomérico em leucócitos mononucleares com recidiva hematológica, transformação maligna e sobrevida na anemia aplástica severa”	
3.1. Tabela 8 - Característica dos pacientes.....	53
3.2. Tabela 9 - Análise multivariada do modelo de risco proporcional de Cox para recidiva, evolução clonal e sobrevida.....	54

LISTA DE FIGURAS

1. Estudo “Resultados a longo termo de pacientes pediátricos com anemia aplástica severa tratados com globulina antitimocítica”
  - 1.1. Figura 1 – Distribuição das idades em pacientes pediátricos com anemia aplástica severa tratados com terapia IS à base de h-ATG.....17
  - 1.2. Figura 2 – Incidência cumulativa de recaída e evolução clonal.....20
  - 1.3. Figura 3 – Sobrevida geral.....21
2. Estudo “Fatores preditivos de resposta à imunossupressão e sobrevida em anemia aplástica severa”
  - 2.1. Figura 4 – Valores de base do hemograma plotados contra a probabilidade estimada de resposta em regressão logística univariada.....32
  - 2.2. Figura 5 – Sobrevida geral com base nos reticulócitos e linfócitos pré-tratamento.....38
  - 2.3. Figura 6 - Sobrevida geral em crianças e adultos com base nos reticulócitos e linfócitos pré-tratamento.....39
3. Estudo “Associação do comprimento telomérico em leucócitos mononucleares com recidiva hematológica, transformação maligna e sobrevida na anemia aplástica severa”
  - 3.1. Figura 7 - Incidência cumulativa de recaída de acordo com o comprimento telomérico pré-tratamento.....55
  - 3.2. Figura 8 - Incidência cumulativa da evolução clonal de acordo com o comprimento telomérico pré-tratamento.....56
  - 3.3. Figura 9 - A sobrevida global de acordo com o comprimento do telômero pré-tratamento e contagem de reticulócitos absoluta.....57

RESUMO

Scheinberg, P. Fatores preditivos de resposta hematológica, recidiva, evolução clonal e sobrevida em pacientes com anemia aplástica severa tratados com terapia imunossupressora [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013

A anemia aplástica severa (AAS) pode ser tratada com sucesso na maioria dos casos com terapia imunossupressora (IS) ou transplante alogênico de medula óssea (TMO). Os principais fatores que determinam a escolha da modalidade terapêutica são a idade e a disponibilidade de um doador HLA-histocompatível. Em pacientes mais jovens, o TMO de um doador aparentado é preferível, enquanto que em pacientes acima de 40-50 anos, a terapia IS é a modalidade terapêutica de escolha. Resposta hematológica é obtida em 60-75% dos casos com terapia IS na AAS, o que correlaciona com melhor sobrevida. Recidivas ocorrem em aproximadamente um terço dos respondentes e evolução clonal para mielodisplasia em 10-15% ao longo termo. A doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) agudo ocorre em 30-40% dos casos sendo a forma crônica presente em 40-50%. Infecções são frequentes e podem complicar o transplante. Portanto, a refratariedade à terapia IS, recidivas e evolução clonal limitam o sucesso da terapia IS na AAS, enquanto rejeição do enxerto, GVHD, e infecções limitam o sucesso do TMO na clínica.

Fatores preditivos dessas complicações seriam de grande valor na clínica, uma vez que poder-se-iam realizar decisões terapêuticas com base mais racional, onde pacientes fossem alocados a diferentes tratamentos com base no seu perfil de risco. Ou seja, pacientes com alta probabilidade de resposta e baixo risco de recidiva e evolução clonal se beneficiariam de terapia IS, enquanto àqueles com baixa probabilidade de resposta e alto risco de recidiva e/ou evolução clonal teriam mais benefícios do TMO, por exemplo. Com base nessa premissa, desenvolvemos estudos para investigar fatores que pudessem estar associados ao sucesso da terapia IS na AAS.

Os principais achados de 3 análises distintas sobre o tema evidenciou: 1) crianças (< 18 anos) apresentam alta taxa de resposta à terapia IS (em torno de 75%) com uma excelente sobrevida geral em pacientes respondentes; 2) o número absoluto de reticulócitos e de linfócitos pré-tratamento correlaciona com resposta hematológica aos seis meses após terapia IS; e 3) o comprimento telomérico não está associado à resposta hematológica, porém, está associado a probabilidade de recidiva, evolução clonal, e sobrevida geral após terapia IS. Esses parâmetros identificados nesses estudos podem servir de base em algoritmos futuros onde faz-se estratificação de risco de cada paciente, a fim de alocar a modalidade terapêutica mais apropriada com base no perfil individual de risco. No que diz respeito ao comprimento telomérico, é provável que esse marcador biológico não só esteja associado ao processo de evolução clonal na AAS, mas que também participe na biologia da instabilidade genômica de células na medula óssea levando a aberrações cromossômicas e o desenvolvimento de mielodisplasia e leucemias.

SUMMARY

Scheinberg, P. Predictive parameters for hematologic response, relapse, clonal evolution and survival in severe aplastic anemia patients treated with immunosuppressive therapy. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013

Severe aplastic anemia (SAA) can be treated successfully in the majority of cases with immunosuppressive therapy (IST) or allogeneic bone marrow transplantation (BMT). The principal factors that determine the choice of treatment modalities are age and availability of an HLA-histocompatible donor. In younger patients, BMT from a related donor is preferred, while in patients over 40-50 years of age, IST is often employed. Hematologic response is achieved in 60-75% of cases with IST, which correlates with better survival. Relapses occur in approximately one third of responders and clonal evolution to myelodysplasia occurs in 10-15% of cases long-term. Acute graft-versus-host disease (GVHD) occurs in 30-40% of cases and chronic GVHD in 40-50%. Infections are common and complicate transplant outcomes. Therefore, refractoriness, relapses and clonal evolution limit the success of IST in SAA, while graft rejection, GVHD, and infections limited the success of BMT in the clinic.

Predictors for these complications would be of great value in the clinic since one could make more rational treatment decisions where patients were allocated to different treatment modalities based on their risk profile. For example, patients with high probability of response and low risk of relapse and clonal evolution would benefit more from IST, while those with low probability of hematologic response and high risk of recurrence and/or clonal evolution most likely to benefit from BMT. Based on this premise, we developed studies to investigate factors that could be associated with the success of IST in SAA.

The main findings of three separate analysis on the subject showed: 1) children (<18 years) have a high response rate to IST (around 75%) with an excellent long-term survival rate among responders; 2) the absolute number of reticulocytes and lymphocytes pre-treatment correlates with hematologic response at 6 months after IST, and 3) telomere length is not associated with hematologic response, but, associated with the likelihood of relapse, clonal evolution, and overall survival after IST. These parameters may serve as a basis for future algorithms allowing for risk stratification for each individual patient allowing for better treatment allocation. With respect to the telomere length, it is likely that it not only represents a biological marker but that it is involved in the process of clonal evolution contributing to genomic instability in bone marrow cells leading to the development of myelodysplasia and leukemia.

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde sua descrição inicial, a anemia aplástica (AA) é identificada como uma doença do paciente jovem. A distribuição etária dos pacientes afetados revela dois picos distintos, o primeiro entre a idade de 15 e 25 (maior incidência) e a segunda após 60 anos de idade (menor incidência). A anemia aplástica pode ser hereditária ou adquirida. Os casos hereditários são comumente identificados por fenótipos característicos: baixa estatura, polegares anormais, hipopigmentação e manchas “café au lait” (na anemia de Fanconi); hiperpigmentação da pele, distrofia ungueal, e leucoplasia (na disqueratose congênita); baixa estatura, alterações ósseas e insuficiência pancreática (na síndrome de Shwachman-Diamond); e ausência do rádio e outras alterações ósseas (na trombocitopenia e ausência do rádio).

O método diagnóstico na anemia de Fanconi é o teste de fragilidade do cromossomo onde células do paciente afetado apresentam quebras acentuadas dos cromossomos quando expostos a mitógenos, como a mitomicina C ou o diepoxibutano. A disqueratose congênita é caracterizada pelo encurtamento telomérico significativo.

1.1 Apresentação clínica

Até recentemente, a AA hereditária era diagnosticada na infância quando havia um quadro de falência medular associado a alterações físicas características. No entanto, anormalidades no exame físico nem sempre estão presentes em crianças com AA hereditária. Mutações em adultos em

genes do complexo da telomerase (característico na disqueratose congênita) foram identificados em pacientes adultos com aparente AA adquirida e que não apresentavam o stigmata classicamente associado aos casos hereditários. Com isso, a distinção entre as formas hereditárias e adquiridas ficaram borradas.

Em ambas as apresentações, hereditária e adquirida, pancitopenia e hipocelularidade da medula óssea são características. Não é possível, com base no hemograma ou aspecto da medula óssea, fazer a diferenciação entre as duas formas de apresentação de falência medular. A AA é um diagnóstico de exclusão onde outras causas de pancitopenia e hipoplasia medular são afastadas. Na maioria das vezes, causas de pancitopenia com medula óssea normocelular são identificadas na história clínica, exame físico, e exames laboratoriais de rotina. Em algumas infecções, na anorexia nervosa e no hipotireoidismo, pode haver hipoplasia medular com ou sem citopenias. Porém, a maior dificuldade é na diferenciação da AA com outras causas de hipocelularidade e pancitopenia, como a síndrome mielodisplásicas (SMD) e algumas formas de leucemias. Uma análise criteriosa das espículas por blastos no aspirado é importante em casos de leucemias e alterações dismórficas, associadas ou não a alterações do cariótipo importantes nos casos de SMD. É importante ressaltar que um grau moderado de displasia pode ocorrer na AA, principalmente na linhagem eritrocítica, especialmente quando há um clone de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) associado. Alterações mais acentuadas nos precursores eritróides, displasia em

precursores granulocíticos (na ausência de fatores de crescimento) e micromegacariócitos são característicos na SMD. Sintomas constitucionais, linfadenomegalia ou hepatosplenomegalia não fazem parte da apresentação típica da AA e sua presença sugere um outro diagnóstico. A principal manifestação clínica na AA está associada às complicações da pancitopenia, ou seja, fraqueza, sangramento mucocutâneo (trombocitopenia) e infecções (neutropenia). Ocasionalmente, a pancitopenia é detectada em um paciente previamente hígido durante um exame de “check up”, em exames de rotina no pré-operatório ou em doadores de sangue. Nesses casos, a pancitopenia é frequentemente moderada podendo com o tempo evoluir para pancitopenia mais grave. A pancitopenia severa é definida por dois dos seguintes três critérios: contagem de neutrófilos absolutos (ANC) $< 500 /\mu\text{L}$, contagem de reticulócitos absolutos (ARC) $< 60\,000 /\mu\text{L}$ e plaquetas $< 20\,000 /\mu\text{L}$ (1).

Após a sua descrição no final do século 19, várias exposições ambientais a agentes químicos, toxinas e drogas foram associadas ao aparecimento da AA. Porém, com poucas exceções, não se estabeleceu uma relação causal e vários relatos não foram reproduzidos em estudos subsequentes. Uma das associações mais bem estabelecidas é a do benzeno que apresenta propriedades mielotóxicas por um efeito de supressão direta da medula óssea e, também, por uma possível reação idiossincrática. Porém, no dia a dia, é muito difícil estabelecer uma associação causal entre uma exposição e o quadro de falência medular, e na prática, essa distinção não parece ser importante, uma vez que o manuseio

não difere quando há ou não uma possível exposição putativa causal. Com isso, a grande maioria dos casos são considerados adquiridos e idiopáticos.

1.2 Fisiopatogenia

Dados laboratoriais e clínicos sugerem que a AA tem uma fisiopatogenia autoimune (2). No laboratório, remoção de linfócitos de medula óssea de pacientes com AA resulta em aumento nas unidades formadoras de colônia e a adição de linfócitos é inibitório *in vitro* (3). As células T efectoras estão ativadas em medula óssea e no sangue periférico na AA. Apresentam também um perfil Th1 com secreção de interferon gama (4) e, mais recentemente, T-bet, um fator de transcrição que se liga ao promotor do interferon gama que está expresso em células T de pacientes com anemia aplástica (5). Estudos de repertório de linfócitos T mostrou que clones CD8⁺CD28⁻ estão expandidos na AA distorcendo a distribuição normal de linfócitos T em favor de clones que reconhecem elementos na medula óssea levando a sua apoptose (6). As células T reguladoras, que controlam e eliminam as células T autorreativas, estão diminuídas na apresentação na maioria dos pacientes com AA (7) enquanto que as células efectoras TH17 estão aumentadas (8). Essas observações *in vitro* foram recapituladas em um modelo animal de AA corroborando para uma fisiopatogenia autoimune (9-12).

1.3 Terapias imunossupressora e transplante de medula óssea

Nos anos 60, a AA em sua forma mais severa (AAS) era fatal em 80-90% dos casos 1-2 anos após o diagnóstico (13). O tratamento na época era limitado ao suporte transfusional e andrógenos, com resposta hematológica observado ocasionalmente (14). As principais causas de morte eram infecções e sangramentos. Com a introdução do transplante alogênico de medula (TMO) nos anos 70 e terapia imunossupressora (IS) nos anos 80, a sobrevida geral (SG) aumentou drasticamente, com 80-90% dos pacientes, hoje em dia, sobrevivendo 1-2 anos após o diagnóstico (15-17). No geral, os resultados com TMO são melhores nos pacientes mais jovens sendo o tratamento de escolha na primeira linha na vigência de um doador aparentado HLA-histocompatível (18). Na ausência de doador e nos pacientes de maior idade (> 40 anos) a terapia imunossupressora é o tratamento de primeira escolha (19-21).

O tratamento IS de escolha é a globulina antitimocítica (ATG) de cavalo (22). A atividade desse agente na AAS foi descoberta de maneira acidental, quando um paciente apresentou reconstituição hematológica autóloga após rejeição do enxerto após condicionamento com ATG (23). A partir dessa observação, estudos usando ATG de cavalo (h-ATG) como terapia imunossupressora em AAS foram conduzidas mostrando resposta hematológica em 40-50% dos pacientes (16, 24). A adição de ciclosporina (CsA) a h-ATG foi bem sucedida, aumentando a reposta hematológica para 60-70% em um estudo randomizado (22). Nos anos 80 e 90, vários estudos nos EUA, Europa e Japão definiram os sucessos e as limitações da terapia

com h-ATG + CsA (1, 25-28). No geral, resposta hematológica é observado em 60-75% dos casos, porém, recidiva ocorre em aproximadamente um terço dos respondentes e evolução clonal (para SMD ou leucemia) em 10-15%. Dentre as complicações tardias (recidiva e evolução clonal), a evolução para SMD e leucemias é a mais preocupante e está associada a maior mortalidade (29). A alteração citogenética com o pior prognóstico é a monossomia do cromossomo 7 que está associada á pancitopenia progressiva não responsiva à terapia IS com alto índice de evolução para SMD e leucemia mielóide aguda (29). Nesse cenário, o único tratamento curativo é o TMO. As recidivas em geral não estão associadas a um prognóstico sombrio e, em geral, nova resposta hematológica é obtida com mais imunossupressão na maioria dos casos (25, 30, 31). Em todos os estudos, resposta hematológica foi uma grande preditivo de SG (2).

O fato de um terço dos pacientes não responder à terapia IS levou a especulação de que nesses casos não haveria uma patogenia autoimune, sendo necessária outras intervenções terapêuticas. O encurtamento telomérico e a descoberta de mutações de genes associados ao complexo da telomerase (por exemplo *TERC*, *TERT*) há 10-15 anos contribuiu para essa noção, uma vez que esses defeitos genéticos poderiam definir a patogenia nesse casos e, portanto, não serem suscetíveis à terapia IS (32-35). Esse complexo é responsável por alongar os fins dos cromossomos, o telômero, que sofre uma erosão fisiológica com cada divisão celular (36). Após várias divisões, o telômero encontra-se suficientemente curto levando a uma cessação da habilidade replicativa da célula, sofrendo apoptose (37,

38). Células com grande potencial replicativo, como as células-tronco e linfócitos, apresentam um complexo da telomerase muito ativo sendo a integridade desse sistema de reparação dos telômeros críticos para a manutenção fisiológica dessas células. Portanto, especula-se que em pacientes que possuem um defeito genético em genes desse complexo pode haver limitação na reparação de células-tronco contribuindo, por exemplo, para a falência medular. Essa fisiopatogenia não estaria amena a intervenções imunossupressoras.

Esse assunto porém é controverso com autoridades na área em desacordo. O fato de 30-77% dos pacientes refratários à terapia inicial com h-ATG serem responsivos a um segundo ciclo de IS argui contra essa hipótese (30, 39, 40). Além do mais, pacientes com mutações em *TERC* ou *TERT* podem responder a terapia IS sugerindo que essas alterações genéticas não são fatores determinantes na patogenia da AAS nesses casos (41). A refratariedade à terapia IS também é consistente com uma depleção muito severa de células-tronco ou mecanismos imunológicos resistentes às terapias atuais.

A decisão terapêutica na prática leva em consideração a idade, disponibilidade de um doador HLA-compatível e comorbidades. A primeira decisão a ser realizada após feito o diagnóstico de AAS é entre terapia IS ou TMO. Em pacientes jovens com doador HLA-compatível, o TMO é preferido e, nos demais casos, terapia IS. As toxicidades, a curto e longo prazos,

associados ao TMO continuam a pesar da decisão dessa modalidade terapêutica. Os riscos de infecção e da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) aumentam com a idade, sendo maior em pacientes acima de 40-50 anos (42). Os riscos de GVHD também são maiores no transplante não aparentado em pacientes de qualquer idade (43, 44). Porém, estudos em anos recentes sugerem que os resultados em crianças e adultos jovens com um doador HLA-compatível não aparentado é similar àqueles com doador aparentado (45, 46). Contudo, dados de registro com número maior de pacientes sugerem que os resultados com doadores não aparentados não são tão favoráveis (43, 47). No geral, os resultados com o transplante alogênico não aparentado vêm melhorando na AAS, provavelmente devido à melhor terapia de suporte, produtos sanguíneos menos imunogênicos (colhidos por aférese e leucodepletados) e melhores protocolos de condicionamento (48). Com isso, no momento o TMO não aparentado HLA-compatível é reservado como terapia de resgate em pacientes não responsivos à terapia IS inicial. Porém, algumas autoridades propõem que devido à melhora de sobrevida com o TMO não aparentado em crianças que essa modalidade seja a primeira opção quando viável.

Marcadores biológicos que predizem resposta hematológica e eventos tardios (recidiva e evolução clonal) seriam de grande valor na decisão terapêutica entre terapia IS e TMO. Por exemplo, em crianças com menor chance de resposta a ATG + CsA ou com risco elevado de recidivas e/ou evolução para SMD um transplante HLA-compatível não aparentado seria

uma melhor opção em primeira linha. Em contraposto, àquelas com risco baixo dessas complicações, terapia IS na ausência de doador aparentado faria mais sentido. Em pacientes de mais idade, naqueles com maior risco de recidivas ou evolução para SMD, transplante de doador aparentado ofereceria maior chance de sobrevida ao longo termo. Em contraposto, àqueles com risco baixo dessas complicações, a terapia IS seria uma opção mais lógica que evitaria as complicações associadas ao TMO.

Na procura de parâmetros que pudesse ajudar nessas decisões na clínica, procuramos no Instituto Nacional de Saúde nos EUA (NIH) desenvolver estudos a fim de associar a resposta hematológica após terapia IS às complicações tardias usando dados demográficos, do hemograma, e biológicos como o comprimento do telômero em células do sangue periférico. O NIH é um centro de referência em falência medular com diversos protocolos clínicos e laboratoriais desenvolvidos ao longo de três décadas com o intuito de melhorar os resultados da terapia a IS na AA e aprofundar o conhecimento da fisiopatogenia dessas enfermidades. Além da base de dados clínicos, a coleta prospectiva de dados laboratoriais e armazenamento de sangue e plasma congelado permite a realização de estudos laboratoriais com amostras de pacientes antes e depois de tratamento IS, possibilitando uma série de iniciativas investigativas. Nessa tese, serão discutidos três desses estudos, todos desenvolvidos com o intuito de melhor prever as chances de resposta hematológica, complicações tardias e sobrevida após terapia IS na AAS.

2 ESTUDO “RESULTADOS A LONGO TERMO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA APLÁSTICA SEVERA TRATADOS COM GLOBULINA ANTITIMOCÍTICA” (*J Pediatrics*. 2008;153:814-9)

2.1 INTRODUÇÃO

Em geral, o resultado do TMO em crianças é superior ao de pacientes com mais idade. O TMO de doador aparentado é a primeira opção terapêutica em pacientes pediátricos com AAS. No entanto, a maioria dos pacientes não são candidatos ao TMO de doador aparentado por não haver um doador HLA-histocompatível na família. Assim, a maioria dos pacientes pediátricos recebem terapia IS na primeira linha. Os resultados com h-ATG/CsA são bem estabelecidos para pacientes de todas as idades. Porém, há poucos dados com esse regime especificamente em crianças, não havendo uma grande série norte-americana até o presente estudo.

Os resultados com TMO de doador não aparentado vêm melhorando ao longo dos anos levando alguns autores a sugerirem que esse transplante fosse oferecido na primeira linha. Porém, na prática, há vários obstáculos para essa estratégia sendo um dos principais a logística com a busca de um doador HLA-histocompatível não aparentado e a coordenação com os centros de registro, centro transplantador e o paciente, um processo que

pode levar meses. O conhecimento a longo prazo da eficácia de h-ATG + CsA em crianças seria de valor e poderia ajudar na decisão terapêutica inicial. A fim de melhor compreender os resultados a longo prazo das crianças tratadas com terapia IS, realizamos uma análise retrospectiva de pacientes pediátricos que receberam terapia IS com h-ATG + CsA no NIH com foco nas taxas de resposta, recidiva, evolução clonal, e SG.

2.2 OBJETIVOS

Entender os resultados a curto e longo prazo em crianças com AAS tratadas com terapia IS com h-ATG + CsA em uma instituição norte-americana de referência em síndromes de falência medular (NIH).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo é uma análise retrospectiva de crianças tratadas em protocolos de terapia IS para AAS, entre novembro de 1989 e dezembro de 2006 no NIH, em Bethesda, Maryland – EUA. Todas as crianças menores de 18 anos que preencheram os critérios de AAS foram inscritas em um dos quatro protocolos sequenciais de imunossupressão: h-ATG + CsA (1989-1999), h-ATG + CsA + micofenolato de mofetila (MMF; 2000-2003) e h-ATG + CsA + sirolimus (2003-2006). Os resultados desses regimes imunossupressores em diferentes protocolos clínicos foram idênticos, por isso, os dados desses estudos foram aglomerados para essa análise. Todos os regimes tinham como base h-ATG + CsA. Pacientes consecutivos tratados nestes quatro protocolos de imunossupressão sequenciais foram analisados.

Todos os pacientes com idade de 7 anos ou mais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido resumido apropriado para a idade. Em todos os casos, os pais ou responsável legal assinaram termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com protocolos aprovados pelo Conselho de Ética e Pesquisa do “National Heart, Lung, and Blood Institute”, NIH em Bethesda, Maryland.

Para fins de protocolo, AAS foi definida como celularidade da medula óssea < 30% e pancitopenia grave com pelo menos dois dos seguintes critérios no sangue periférico: 1) contagem absoluta de neutrófilos (ANC) < 500 / μ L, 2) contagem absoluta de reticulócitos (ARC) < 60 000/ μ L, 3) contagem de plaquetas < 20 000 / μ L. Resposta hematológica foi definida como índices no hemograma que não mais satisfaziam os critérios para AAS, e foi determinado em três e seis meses após a terapia com h-ATG + CsA (1). Este critério associa com a independência de transfusão e sobrevivência (1). Uma resposta completa (RC) foi definida como a realização de todos os seguintes critérios: 1) ANC > 1 000/ μ L, 2) hemoglobina > 10 g/dL, 3) contagem de plaquetas > 100 000/ μ L. Uma resposta parcial (RP) foi definida como contagens de sangue que não satisfazia critérios para AAS mas eram insuficientes para critério de RC. Recidiva não foi definida com base na contagem de células do sangue, mas sim, como qualquer necessidade de reinstituição de terapia IS (25).

Biopsia de medula óssea + aspirado, incluindo citogenética, foram realizadas antes da inclusão nos estudos. Todos os pacientes foram testados para anemia de Fanconi com exposição *in vitro* de linfócitos a diepoxibutano e, em alguns casos, também para a mitomicina C. O teste para HPN foi feito usando o teste de Ham até o ano de 2000, quando foi substituído por um ensaio de citometria de fluxo (49). A presença de um clone foi definida como a ausência de proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI)- em > 1% de neutrófilos ou células vermelhas (50).

2.3.1 Regimes imunossupressores

Um teste subcutâneo foi realizado em todos os pacientes para avaliar a hipersensibilidade a proteínas no soro equino. H-ATG (ATGAM; Pfizer, Kalamazoo, Michigan) foi administrado por via intravenosa a uma dose de 40 mg/kg/dia durante quatro dias consecutivos. Profilaxia contra a doença do soro foi com prednisona oral 1 mg/kg/dia antes da primeira dose de ATG e continuada por 17 dias. CsA foi administrada com a ATG em 12 mg/kg/dia por via oral (15 mg/ kg/dia para crianças com idade inferior a 12 anos) em doses divididas em períodos de 12 horas e foi continuado durante seis meses, com a dosagem ajustado para manter os níveis séricos entre 200 e 400 ng/ml. Profilaxia contra doença do soro, o 4-dias de infusão de h-ATG, e os seis meses de CsA foram idênticos em todos os regimes estudados (25, 51, 52). MMF foi dosado no primeiro dia da ATG a 600 mg/m² duas vezes por dia em crianças com idades de 11 anos ou menos, e 1 g, duas vezes por dia em crianças com idade de 12 anos ou mais e nos adultos, em um total de 18

meses (51). Sirolimus foi iniciado no dia 1 a 2 mg/dia; em crianças pesando menos de 40 kg, a dose foi de 1 mg/m²/dia, administrada por seis meses com níveis séricos alvo entre 5 a 15 ng/ml (52). Fator estimulador de colônias de granulócitos não foi administrado rotineiramente em conjunto com IS. Os pacientes foram submetidos à biopsia de medula óssea 3, 6 e 12 meses, e depois anualmente. Evolução para SMD foi definido como o aparecimento de uma nova alteração clonal na citogenética ou o aparecimento de alterações displásicas na medula óssea.

2.3.2 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Estatísticas sumárias, incluindo as médias, proporções, e seus correspondentes desvios-padrão foram utilizados para descrever a idade dos pacientes, sexo e outras características basais. Valores de P com base em testes de proporções e análise de variância F foram usados para comparar as características iniciais dos pacientes entre os grupos de tratamento. A amostra, e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), foi utilizada para descrever as taxas de resposta em seis meses para os pacientes classificados por fatores de risco distintos. Testes para proporções foram usados para comparar as taxas de resposta de seis meses para os pacientes em grupos de risco diferentes. Probabilidades de sobrevivência a longo prazo para pacientes com riscos de base discretas e contínuas foram avaliados utilizando Kaplan-Meier e o modelo de Cox de riscos proporcionais, com os pacientes que foram perdidos no seguimento contado como

censurado. Os resultados numéricos foram calculados usando o pacote de estatística S-PLUS (Insight Inc, Seattle, Washington).

2.4 RESULTADOS

As 77 crianças (menores de 18 anos) foram tratadas com terapia IS inicial com base em h-ATG entre 1989 e 2006. Características da coorte estão resumidas na Tabela 1, e a distribuição das idades na Figura 1.

Tabela 1. Características dos pacientes

	Todos os pacientes		H-ATG/CsA (1989 – 2006)		H-ATG/CsA/MMF (2000 – 2003)		H-ATG/CsA/Rapa (2003 – 2005)	
	N(%)	Média ± SD	N(%) SD	Média ±	N(%)	Média ± SD	N(%)	Média ± SD
Total	77	-----	46	-----	21	-----	10	-----
Idade (anos)	-----	11,4 ± 0,52	-----	11,6 ± 0,66	-----	11 ± 1,1	-----	11,8 ± 1,5
Sexo								
Masculino	50(65)	-----	29(63)	-----	14(67)	-----	7(70)	-----
Feminino	27(35)	-----	17(37)	-----	7(33)	-----	3(30)	-----
Etiologia								
Idiopático	69(90)	-----	41(89)	-----	18(86)	-----	10(100)	-----
Pós-hepatite	8(10)	-----	5(11)	-----	3(14)	-----	--	-----
							0	-----
							--	
Basal (/μL)								
ANC		289 ± 31		290 ± 44		268 ± 47		335 ± 81
ALC		1 264 ± 78		1 295 ± 103		1 162 ± 149		1 335 ± 216
ARC		20 540 ± 2 244		19 232 ± 3 013		23 021 ± 4 185		21 344 ± 5 873
Plaquetas		11 390 ± 1 158		10 283 ± 1 264		14 619 ± 3 062		9 700 ± 1 832
HPN								
< 1%	28(74)	-----	7(64)	-----	13(72)	-----	8(89)	-----
≥ 1%	10(26)	-----	4(36)	-----	5(28)	-----	1(11)	-----

h-ATG/CsA/Rapa, h-ATG + CsA + sirolimus; h-ATG/CsA/MMF, h-ATG + CsA + micofenolato de mofetila; HPN, clone de hemoglobinúria paroxística noturna; SD, desvio padrão; ANC, contagem absoluta de neutrófilos; ALC, contagem absoluta de linfócitos; ARC, contagem absoluta de reticulócitos. Não houve diferença estatística entre os 3 regimes de terapia IS.

Figura 1. Distribuição das idades em pacientes pediátricos com AAS tratados com terapia IS a base de h-ATG.

A taxa de resposta global em seis meses foi de 74% (57/77), 35% tiveram uma RC e 65% tiveram uma RP. A incidência cumulativa de recaída em dez anos foi de 33%; o tempo médio para a recaída foi 558 dias (Figura 2, painel de acima). Não houve diferença na incidência de recaídas entre aqueles com RC e aqueles com RP. Dos 14 pacientes que recaíram, a maioria receberam terapia IS adicional e 3 foram submetidos ao TMO. Entre os 16 pacientes refratários, 9 foram submetidos ao TMO e 5 receberam um ciclo adicional de IS.

A taxa de resposta hematológica em crianças com menos de 12 anos (idade média do grupo) foi de 80% (31/39) e 68% (26/38) naqueles com idade superior a 12. No total, 37 pacientes tinham um ANC basal $< 200 /\mu\text{L}$, dos quais 24 (65%) responderam, e em 40 pacientes o ANC basal era $\geq 200 /\mu\text{L}$, dos quais 33 (83%) responderam ao IST ($P = 0,12$). Quando os 4 pacientes com ANC $< 200 /\mu\text{L}$ que morreram antes de completar seis meses de IS foram excluídos, a taxa de resposta para os doentes com valores basais ANC $< 200 /\mu\text{L}$ subiu para 73% (24/33).

A incidência cumulativa de evolução clonal foi de 8,5%; todos os três eventos ocorreram nos respondedores parciais (Figura 2, painel de baixo). As alterações citogenéticas detectadas foram monossomia 7 em 2 pacientes e deleção 13q em 1 paciente. Nessa coorte, não houve casos de evolução para leucemia mieloide aguda.

No total, 13 pacientes morreram, com 4 mortes ocorrendo dentro dos 3 primeiros meses após IS em pacientes com um ANC basal $< 100 /\mu\text{L}$ (2 devido à infecção fúngica, 1 devido à septicemia bacteriana, e 1 devido a uma hemorragia gastrointestinal em um momento quando não havia suporte transfusional adequado). As demais 9 mortes ocorreram após os seis meses da terapia IS (5 após TMO, 3 por infecção fúngica, e 1 por septicemia). O tempo mediano até a morte foi de 570 dias.

A SG em 10 anos para toda a coorte foi de 80%. Quando os doentes que foram submetidos ao TMO foram censurados no momento do TMO, a SG foi de 90% (Figura 3, painel de cima). Sobrevida geral a longo prazo nos pacientes que responderam a terapia IS foi de 89% (Figura 3, painel de baixo).

Como vários hospitais pediátricos nos EUA atendem a pacientes até a idade de 21 anos, fizemos uma análise separada em pacientes entre 18 e 21 anos de idade. Um total de 35 pacientes, nessa faixa etária, foram tratados com h-ATG entre 1989 e 2006. A taxa geral de resposta hematológica nesse grupo foi de 60% (21/35). Dos 21 que responderam, sete (33%) recaíram. Dois pacientes evoluíram para monossomia 7, e um paciente desenvolveu um diagnóstico morfológico de mielodisplasia. Entre os 14 que não responderam, cinco receberam TMO e seis um segundo ciclo de IS, dois morreram e um ficou recebendo terapia de suporte. Houveram seis óbitos nesse grupo: quatro em não-respondedores, um após recidiva, e um paciente com ANC basal de zero por μL que morreu antes de completar três meses de IST. A taxa de resposta hematológica, neste grupo etário, aproxima àquela vista em pacientes com AAS de todas as idades tratados com terapia IS.

Figura 2. Incidência cumulativa de recaída e evolução clonal. Painel de cima. Incidência cumulativa de recaída (com 95% IC) em pacientes pediátricos após resposta inicial a terapia IS com base em h-ATG. **Painel de baixo.** Incidência cumulativa de evolução clonal (com 95% IC) após todos os pacientes que receberam tratamento inicial com h-ATG.

Figura 3. Sobrevida geral. Painel de cima. Sobrevida geral (com 95% IC) em toda a coorte (censurado para TMO). **Painel de baixo.** Sobrevida geral (com 95% IC) em pacientes responsivos à terapia inicial com IS.

2.5 DISCUSSÃO

O TMO é o tratamento inicial em crianças com AAS que têm um irmão doador HLA compatível. Esta escolha é baseada em estudos retrospectivos demonstrando a superioridade do transplante sobre IS em crianças (53-55). Porém, esses estudos incluíram pacientes na década de 70 e 80 tratados com ATG sem CsA. Em dois grandes estudos prospectivos em crianças, os resultados com a combinação h-ATG + CsA obtiveram uma resposta hematológica em torno de 70% com taxas de sobrevida em 3-4 anos em torno de 85-90%, taxas similares (18) ao reportado com TMO de doador aparentado histocompatível (26, 28, 56).

Em nossa análise retrospectiva, a maior conduzida nos EUA sobre o tema, a experiência é semelhante a dos estudos alemão e japonês. A taxa de resposta de 74% após IS em crianças é superior à taxa previamente relatada de cerca de 60% em pacientes de todas as idades (25). As crianças que responderam ao IS tiveram uma sobrevida a longo prazo excelente, em torno de 90%. Muitos dos que não responderam à IS em nossa casuística foram submetidos com sucesso ao TMO (57). Em geral, o resultado após o transplante (em doadores HLA-compatíveis aparentados ou não) tem sido mais favorável nos últimos 10-15 anos (46). Apesar desses avanços, estudos prospectivos com doador não aparentado têm sido pequenos. O condicionamento ideal permanece indefinido sendo utilizados vários regimes que envolvem irradiação com seguimento ainda relativamente curto (2, 19). É desejável que condicionamentos que não incluam radiação sejam

desenvolvidos a fim de evitar possíveis complicações tardias (tumores secundários), retardo no crescimento e desenvolvimento de crianças, e que a taxa de GVHD seja muita baixa, uma vez que, por se tratar de uma condição não maligna, não há benefício algum dessa complicação imunológica no TMO para AAS (58, 59). Portanto, tendo em vista a alta taxa de resposta e sobrevida em crianças tratadas com o IST, os nossos dados suportam o tratamento inicial com terapia IS em todas as crianças com AAS que não possuem um doador histocompatível aparentado.

3 Estudo “FATORES PREDITIVOS DE RESPOSTA À IMUNOSSUPRESSÃO E SOBREVIDA EM ANEMIA APLÁSTICA SEVERA” (*Br J Haematol.* 2009; 144: 206-16)

3.1 INTRODUÇÃO

Apesar do melhor entendimento da fisiopatogenia que leva a destruição de elementos primitivos da medula óssea na AA, não é possível prever resposta à terapia imunossupressora usando métodos laboratoriais de rotina. Essa informação seria de valor na clínica, uma vez que pacientes com probabilidade mais baixa de responder à imunossupressão seriam beneficiados por terapias de transplante evitando, assim, exposição a produtos sanguíneos e risco de infecções. Em contrapartida, aqueles com maior probabilidade de resposta à terapia IS seriam mais beneficiados por tratamento com imunossupressores evitando as complicações de curto e longo prazos associadas aos transplantes.

Alguns modelos prognósticos foram propostos nas décadas de 70 e 80 porém nenhum ganhou aceitação por serem pouco práticos ao incluírem fórmulas complexas além de depender de parâmetros subjetivos como morfologia das células da medula óssea e sua quantificação (60-64). Mais recentemente, métodos mais sofisticados em laboratório foram associados a resposta à IS. No entanto esses não são facilmente conduzidos na prática do dia a dia ou não foram reproduzidos (65-67). Com isso, o objetivo do presente

estudo foi identificar parâmetros disponíveis na prática clínica que poderiam estar associados a resposta terapêutica imunossupressora e melhor SG.

3.2 OBJETIVO

Determinar se há parâmetros em exames de sangue de rotina que predizem a resposta hematológica à terapia IS na AAS.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes consecutivos que preencheram critérios para AAS participaram de estudos com terapia IS em quatro diferentes protocolos de tratamento sequenciais, entre novembro de 1989 a abril de 2005 no NIH. Todos os pacientes adultos ou pais (ou guardião legal) de crianças (<18 anos de idade) assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com o Conselho de Ética e Pesquisa institucional do NHLBI, NIH. AAS foi definida como uma celularidade da medula óssea de menos de 30% e pancitopenia grave com pelo menos dois dos seguintes critérios: 1) ANC < 500 / μ L; 2) ARC < 60 000 / μ L; 3) contagem de plaquetas < 20 000 / μ L (1). A resposta hematológica foi definida como não preenchendo mais critério de AAS no hemograma e foi determinada aos três e seis meses após ATG (1). Para essa análise, a resposta hematológica aos seis meses após h-ATG foi adotada como critério para a recuperação hematológica.

Biopsia e aspirado de medula óssea para a morfologia e citogenética foram realizadas antes do ingresso nos protocolos. Crianças e adultos jovens

(menos de 40 anos de idade) tiveram seus linfócitos expostas *in vitro* com diepoxibutano e em alguns casos também para a mitomicina C para excluir anemia de Fanconi. Todos os pacientes foram testados para HPN com o teste de Ham até 2000, quando foi substituído por um ensaio de citometria de fluxo (50). A presença de um clone utilizando citometria de fluxo foi definida como a ausência de proteínas ancoradas a GPI maior do que 1% de neutrófilos ou células vermelhas (50).

Três regimes com base em h-ATG foram incluídos na análise: h-ATG/CsA, h-ATG/CsA/MMF e h-ATG/CsA/sirolimus (25, 51, 52). H-ATG (ATGAM, Pfizer, Kalamazoo, Michigan), a CsA e prednisona para profilaxia da doença do soro foram idênticas nos diferentes protocolos clínicos. MMF foi dosada no primeiro dia de ATG a 600 mg/m² duas vezes por dia para crianças de 11 anos e mais jovem e menos 1 g duas vezes por dia para crianças de 12 ou mais e adultos, para um total de 18 meses. Sirolimus foi iniciado no dia 1 a 2 mg/d em adultos e 1 mg/m² por dia em crianças (< 40 kg) e administrado por seis meses com níveis séricos alvo entre 5 e 15 ng/ml.

As variáveis incluídas na análise foram HPN, idade, e os resultados do hemograma automatizado completo. O nível de hemoglobina (e o volume corpuscular médio) não foram considerado fidedigno devido à variabilidade do limiar para transfusão de sangue, a resposta individual à transfusão e a influência do clone HPN concomitante. Para dar conta de variações biológicas e instrumentais e minimizar os efeitos de fatores de crescimento

hematopoiéticos e transfusões o menor valor durante as quatro semanas antes do início do h-ATG foi definido como "basal" e as variáveis incluídas foram a ARC, ANC, ALC e a contagem de plaquetas.

3.3.1 Métodos estatísticos

Sumário estatístico incluindo médias, estimação de proporções e os seus respectivos desvios-padrão foram utilizados para descrever as idades dos pacientes, o sexo, e outras características de base. A análise de variância F foi utilizada para comparar as características de base. Testes de proporções foram utilizados para comparar a taxa de resposta aos seis meses nos diferentes grupos.

Para efeito de análise estatística, os pacientes que não completaram seis meses de IS inicial devido a morte, transplante ou que foram submetidos a um segundo ciclo de IS foram contados como não-respondedores. Análise univariada e multivariada foram utilizadas para avaliar os efeitos dos riscos de base contínua sobre as probabilidades de resposta e as probabilidades de sobrevida. Covariáveis importantes nos modelos de regressão logística multivariada foram escolhidas pelos procedimentos de seleção de variáveis stepwise.

Para o propósito de apresentar uma imagem simplificada dos efeitos das covariáveis na probabilidade de resposta e sobrevida foram também consideradas variáveis categóricas para ARC ($< 25\,000/\mu\text{L}$, $\geq 25\,000/\mu\text{L}$),

ALC ($< 1\,000 /\mu\text{L}$, $\geq 1\,000 /\mu\text{L}$), ANC ($< 200 /\mu\text{L}$, $\geq 200 /\mu\text{L}$) e contagem de plaquetas ($< 10\,000 /\mu\text{L}$, $\geq 10\,000 /\mu\text{L}$). Probabilidades de sobrevida para todos os pacientes com riscos de base discretas e contínuas foram avaliadas utilizando as estimativas de Kaplan-Meier e o modelo de Cox. Pacientes submetidos a transplante ou perdidos no seguimento foram censurados. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados numéricos foram computados pelo pacote estatístico S-PLUS (Insightful Inc.).

3.4 RESULTADOS

Um total de 316 pacientes receberam IS para AAS à base de h-ATG/CsA no NIH entre 1989 e 2005 em quatro diferentes protocolos clínicos, onde três regimes foram estudados: h-ATG/CsA (usado em dois protocolos), h-ATG/CsA + MMF, e h-ATG/CsA + sirolimus. Esses regimes produziram resultados praticamente idênticos e foram, portanto, combinados para esta análise. Apenas os pacientes que receberam um regime baseado em h-ATG/CsA como a sua terapia inicial foram incluídos. Aos seis meses após IS, 286 pacientes foram avaliáveis para resposta; 25 pacientes morreram e cinco pacientes receberam terapias alternativas antes de completar seis meses, devido à deterioração clínica. O número de pacientes em cada regime e as características de base estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Característica dos pacientes

H-ATG/CsA, globulina antitimocítica de cavalo + ciclosporina; H-ATG/CsA/MMF, globulina antitimocítica de cavalo + ciclosporina + micofenolato de mofetila; H-ATG/CsA/Rapa, globulina antitimocítica de cavalo + ciclosporina + sirolimus; ARC, contagem absoluta de reticulócitos; ALC, contagem absoluta de linfócito; ANC, contagem absoluta de neutrófilos; HPN, hemoglobinúria paroxística noturna; IS, imunossupressão; SD, desvio-padrão; 25-75 IQ, 25-75% intervalo interquartil.

	H-ATG/CsA		H-ATG/CsA/MMF		H-ATG/CsA/Rapa		P
	N (%)	Mediana (25-75 IQ)	N (%)	Mediana (25-75 IQ)	N (%)	Mediana (25-75 IQ)	
Total	177		104		35		
Idade		31 (18, 53)		30 (19, 36)		26 (17, 45)	0,532
Sexo (%)							
Masculino	100 (57)		64 (62)		21 (60)		0,700
Feminino	77 (43)		40 (38)		14 (40)		
Etiologia							
Idiopático	165 (93)		95 (91)		35 (100)		0,206
Pós-hepatite	12 (7)		9 (9)		0		
Basal (μL)							
ANC		250 (80, 449)		289 (87, 461)		340 (122, 563)	0,608
ALC		1 224 (749, 1 633)		1 248 (781, 1 643)		1 211 (969, 1 441)	0,563
ARC		12 250 (5 200, 28 050)		14 121 (4 882, 30 000)		13 400 (3 750, 27 000)	0,733
Plaquetas		9 000 (5 000, 14 000)		9 000 (6 000, 13 250)		7 000 (5 000, 11 000)	0,141
HPN (%)							
<1%	25 (60)	-----	60 (60)	-----	27 (77)	-----	0,166
≥1%	17 (40)	-----	40 (40)	-----	8 (23)	-----	

Na análise de regressão logística univariada, idade mais jovem, maiores níveis de ARC, ALC e ANC correlacionaram a resposta hematológica aos seis meses. A presença de um clone HPN ou contagem de plaquetas não foi preditivo (Tabela 3). A demonstração gráfica que mostra a correlação entre ARC, ALC, ANC e HPN com resposta hematológica aos seis meses está representada na Figura 4. Pacientes com menores índices de ARC e ALC tiveram uma menor probabilidade de resposta à terapia IS (Fig. 4A e B). A relação entre ANC e resposta não foi tão forte, e não foi observada uma correlação com clone HPN ou plaquetas. Houve uma relação inversa entre a resposta e idade. Os pacientes mais jovens tiveram uma maior probabilidade de resposta em comparação aos pacientes mais velhos (Fig. 4F). A análise de variáveis categóricas mostrou que pacientes com $ARC \geq 25\,000/\mu L$, $ALC \geq 1\,000/\mu L$, $ANC \geq 200/\mu L$ e idade inferior a 18 anos apresentaram uma maior probabilidade de resposta aos seis meses (Tabela 4).

Na análise multivariada, apenas a idade mais jovem, ARC e ALC foram preditivos de resposta aos seis meses (Tabela 3). A ausência da correlação com ANC foi resultado de haver maior número de mortes prematuras naqueles com ANC baixo, que foram analisados como não respondedores. Dos 25 pacientes que evoluíram a óbito antes dos seis meses, 23 (82%) tinham um ANC de base $< 200/\mu L$. Quando os dados dos 286 pacientes que foram avaliáveis aos seis meses foram submetidos à análise multivariada, ARC e ALC pré-tratamento apenas ($P = 0,005$ e $0,036$, respectivamente) foram preditivos da resposta, juntamente com idade mais jovem ($P = 0,018$).

Tabela 3. Regressão logística uni- e multivariada para fatores de risco continuou na resposta hematológica aos 6 meses.

Risco basal	Regressão logística univariada			Regressão logística multivariada*		
	Coeficiente (β)	SD	P	Coeficiente (β)	SD	P
Log (ARC+1)	0,4708	0,1077	< 0,0001	0,4480	0,110	< 0,0001
Log (ALC+1)	0,4852	0,1744	0,0054	0,3999	0,1870	0,0325
Log(ANC+1)	0,3559	0,0802	< 0,0001	-----	-----	-----
Log (Plt+1)	0,1083	0,1460	0,4581	-----	-----	-----
Log (PNH+1)	0,0888	0,1324	0,5022	-----	-----	-----
Log (Idade+1)	-0,6571	0,1866	0,0004	-0,7386	0,1968	< 0,0001

Valores transformados em log são usados

*Modelo utilizando o método de stepwise do software S-PLUS.

---- Variáveis deletadas pelo procedimento de stepwise.

ARC, contagem absoluta de reticulócitos; ALC, contagem absoluta de linfócitos; ANC, contagem absoluta de neutrófilos; Plt, plaquetas; HPN, hemoglobinúria paroxística noturna; SD, desvio-padrão.

Figura 4. Valores de base do hemograma plotados contra a probabilidade estimada de resposta baseado em regressão logística univariada. (A) Uma correlação positiva foi observada entre a contagem de reticulócitos absoluta (ARC); **(B)** contagem absoluta de linfócitos (ALC); **(C)** contagem absoluta de neutrófilos (ANC) e resposta aos 6 meses. **(D)** Não houve correlação significativa entre a contagem de plaquetas de base; **(E)** ou o tamanho do clone HPN e resposta hematológica. **(F)** Idade correlacionou-se inversamente com a probabilidade de resposta aos 6 meses. As barras verticais "|" representam os valores de covariáveis para resposta (em cima) e não respondedores (baixo). As linhas pontilhadas representam os 95% de intervalos de confiança.

Tabela 4. Análise univariada da taxa de resposta aos 6 meses.

	Numero de pacientes (%)	Resposta aos 6 meses			P
		Numero	%	95% IC	
H-ATG*	316 (100)	194	61,4	(56,0, 66,8)	-----
Variável					
ARC (/µL)					
≥ 25 000	96 (30)	77	80,2	(72,1, 88,3)	< 0,0001
< 25 000	220 (70)	117	53,2	(46,5, 59,8)	
ALC (/µL)					
≥ 1 000	200 (63)	139	69,5	(63,1, 75,9)	0,0001
< 1 000	116 (37)	55	47,4	(38,2, 56,6)	
ANC (/µL)					
≥ 200	188 (59)	128	68,1	(61,4, 74,8)	0,0030
< 200	128 (41)	66	51,6	(42,8, 60,3)	
Plaquetas (/µL)					
≥ 10 000	130 (41)	85	65,4	(57,1, 73,7)	0,2243
< 10 000	186 (59)	109	58,6	(51,5, 65,7)	
HPN					
≥ 1%	65	39	60,6	(47,8, 72,2)	0,8895
< 1%	112	66	58,9	(49,7, 68,2)	
Idade (anos)					
< 18	78 (25)	58	74,4	(64,5, 84,3)	0,0199
18 a 60	187 (59)	109	58,3	(51,2, 65,4)	
> 60	51 (16)	27	52,9	(38,8, 67,1)	

* Inclui todos os regimes com base em h-ATG

ARC, contagem absoluta de reticulócitos; ALC, contagem absoluta de linfócitos; ANC, contagem absoluta de neutrófilos; HPN, hemoglobinúria paroxística noturna; SD, desvio-padrão.

Quando os dois fatores preditivos ARC e ALC foram combinados na análise multivariada, pacientes com ARC ≥ 25 000 /µL e ALC ≥ 1 000 /µL tiveram uma taxa de resposta 40% superior em relação àqueles com ARC base < 25 000 /µL e ALC < 1 000 /µL (83% vs. 41%, respectivamente) (Tabela 4).

Em geral, a probabilidade de resposta foi maior em pacientes com uma $ARC \geq 25\,000/\mu L$, independentemente do ALC, indicando a predominância de reticulócitos como um parâmetro preditivo (Tabela 5). Entre os pacientes com $ARC < 25\,000/\mu L$, o nível da ALC deu origem a dois grupos distintos: aqueles com $\geq 1\,000/\mu L$, com uma taxa de resposta de 62%; e aqueles com $< 1\,000/\mu L$, com uma taxa de resposta de 41%. Estes dados sugerem que três grupos (aproximadamente um terço dos pacientes em cada) na nossa coorte tiveram um prognóstico distinto: aqueles com uma ARC pré-tratamento elevada (independentemente da ALC), que têm cerca de uma taxa de resposta de 80% (cerca de 20% maior do que toda a coorte); aqueles com uma $ARC < 25\,000/\mu L$ e $ALC \geq 1\,000/\mu L$ com uma taxa de resposta de 62% (a taxa de resposta global para toda a coorte); e aqueles com ambos baixos, $ARC < 25\,000/\mu L$ e $ALC < 1\,000/\mu L$, com uma taxa de resposta de 41% (cerca de 20% menor do que toda a coorte) (Tabela 5).

Cerca de 25% dos doentes tratados com um regime de h-ATG eram crianças com idade inferior a 18 anos. Como uma idade mais jovem é preditivo de resposta hematológica à terapia IS, uma análise de outros indicadores em crianças pode não ter poder estatístico devido ao menor tamanho da amostra em nossa casuística. Por isso, uma análise separada exploradora dos pacientes pediátricos não foi realizada. No entanto, quando os critérios preditivos acima da ARC e ALC foram aplicados a pacientes pediátricos, o ALC não foi preditivo. No entanto, a $ARC \geq 25\,000/\mu L$ permaneceu um parâmetro preditivo significativo de resposta, com uma taxa de resposta de 90% (26/29)

em comparação com 65% (31/48) naqueles com uma ARC < 25 000 / μ L (P = 0,02).

Tabela 5. Análise multivariada da taxa de reposta aos seis meses

	Numero de pacientes (%)	Resposta aos seis meses			P
		Numero	%	95% IC	
H-ATG*	316 (100)	194	61,4	(56,0, 66,8)	-----
Fator de risco (/μL)					
ARC $\geq$ 25 000 & ALC $\geq$ 1 000	71 (22)	59	83,1	(74,2, 92,0)	
ARC $\geq$ 25 000 & ALC < 1 000	25 (8)	18	72,0	(53,1, 90,9)	0,2354**
ARC < 25 000 & ALC $\geq$ 1 000	129 (41)	80	62,0	(53,5, 70,5)	0,0018**
ARC < 25 000 & ALC < 1 000	91 (29)	37	40,7	(30,4, 50,9)	< 0,0001**

* Inclui todos os regimes com base em h-ATG

** P – comparativo dos 3 grupos com o grupo ARC $\geq$ 25 000 / μ L e ALC $\geq$ 1 000 / μ L. ARC, contagem absoluta de reticulócitos; ALC, contagem absoluta de linfócitos; ANC, contagem absoluta de neutrófilos.

A importância do ARC e ALC foi investigada em pacientes tratados em diferentes períodos e mantiveram-se preditivos, com aqueles com ARC $\geq$ 25 000 / μ L e ALC $\geq$ 1 000 / μ L tendo uma maior taxa de resposta em comparação àqueles com um ARC < 25 000 / μ L e ALC < 1 000 / μ L: 1989-1995 (75% vs. 43%, P = 0,035), 1996-2001 (88% vs. 55%, P = 0,003) e 2002-2005 (83% versus 23%, P <0,0001), respectivamente. Esta análise indica que a influência do ARC e ALC foi consistente ao longo dos anos. Análises semelhantes foram realizadas para os pacientes tratados com os diferentes regimes de h-ATG, que mostraram resultados consistentes.

Os dois parâmetros que foram preditivos da resposta (ARC e ALC) também previram a sobrevida em seis meses após o ATG por análise

univariada. No entanto, a análise multivariada mostrou que o ANC era um contribuinte mais significativo para a sobrevivência a curto prazo do que qualquer ARC ou ALC (Tabela 6). Na análise multivariada, os pacientes com maior ARC e ALC tiveram uma taxa de sobrevida a curto prazo 20% mais alto, quando comparados àqueles com menor ARC e ALC (100% vs. 80%, respectivamente, $P < 0,01$). O mesmo resultado foi também encontrado para SG a longo prazo: os doentes com ARC e ALC maiores tinham uma probabilidade maior de sobrevida em 5 anos (92%) quando comparados aos pacientes com menor ARC e ALC de base (53%, $P < 0,001$) (Fig. 5). A SG de acordo com os parâmetros preditivos para crianças (idade < 18) e adultos estão apresentados separadamente na Figura 6. A probabilidade estatisticamente significativa de sobrevida foi observada em adultos com um ARC de pré-tratamento $\geq 25\,000/\mu\text{L}$ em comparação com aqueles com um ARC $< 25\,000/\mu\text{L}$ e ALC $< 1\,000/\mu\text{L}$. Em crianças com um ARC $\geq 25\,000/\mu\text{L}$, uma maior probabilidade de sobrevivência foi observada em comparação com aqueles com um ARC $< 25\,000/\mu\text{L}$, mas essa diferença não foi significativa em nível $\alpha = 0,05$, provavelmente devido ao menor tamanho da amostra e uma melhor taxa de resposta global observada em pacientes pediátricos (68). Em análise de regressão logística, quando apenas os adultos (18 anos ou mais) foram analisados, o ARC e ALC permaneceram preditivos de resposta à terapia IS (Tabela 7).

Tabela 6. Regressão logística uni- e multivariada de parâmetros do hemograma com sobrevida nos 6 primeiros meses após IS

Regressão logística univariada				Regressão logística multivariada*		
Risco de base	Coeficiente (β)	SD	P	Coeficiente (β)	SD	P
Log (ARC+1)	0,4855	0,1410	0,0006	-0,2022	0,1719	< 0,2394
Log (ALC+1)	0,7711	0,2396	0,0013	-----	-----	-----
Log (ANC+1)	0,7571	0,1152	< 0,0001	0,8755	0,1586	< 0,0001
Log (Plt+1)	0,1425	0,2375	0,5485	-----	-----	-----
Log (PNH+1)	0,4362	0,4404	0,3219	-----	-----	-----
Log (Idade+1)	-0,7244	0,3351	0,0306	-----	-----	-----

Valores transformados em log são usados

* Variáveis deletadas pelo modelo de stepwise do software S-PLUS.

ARC, contagem absoluta de reticulócitos; ALC, contagem absoluta de linfócitos; ANC, contagem absoluta de neutrófilos; Plt, plaquetas; HPN, hemoglobinúria paroxística noturna; SD, desvio-padrão.

Tabela 7. Regressão logística uni- e multivariada de parâmetros do hemograma com resposta hematológica em adultos

Regressão logística univariada				Regressão logística multivariada*		
Risco de base	Coeficiente (β)	SD	P	Coeficiente (β)	SD	P
Log (ARC+1)	0,5726	0,1300	< 0,0001	0,4260	0,1763	0,0157
Log (ALC+1)	0,7408	0,2209	0,0008	0,5777	0,2360	0,0144
Log (ANC+1)	0,3770	0,0943	< 0,0001	0,1064	0,1280	0,4095
Log (Plt+1)	0,0004	0,1641	0,9982	-----	-----	-----
Log (PNH+1)	0,0170	0,1468	0,9076	-----	-----	-----
Log (Idade+1)	-0,5968	0,3201	0,0623	-----	-----	-----

Valores transformados em log são usados

* Variáveis deletadas pelo modelo de stepwise do software S-PLUS.

ARC, contagem absoluta de reticulócitos; ALC, contagem absoluta de linfócitos; ANC, contagem absoluta de neutrófilos; Plt, plaquetas; HPN, hemoglobinúria paroxística noturna; SD, desvio-padrão.

Figura 5. Sobrevida geral com base no ARC e ALC pré-tratamento. A probabilidade de sobrevida em todos os pacientes com uma alta contagem de reticulócitos base absoluta (ARC), ARC baixa e uma alta contagem de linfócitos absoluta (ALC), e um ARC baixo e ALC (μL). Aqueles que foram submetidos ao TMO foram censurados no momento do transplante.

Figura 6. Sobrevida geral em crianças e adultos com base nos reticulócitos e linfócitos pré-tratamento. (A) A probabilidade de sobrevida em crianças com menos de 18 anos ($N = 77$) de acordo com o número absoluto de reticulócitos (ARC / μ L) com transplante de medula óssea (TMO) censurado (painel de cima) ou não (painel de baixo) (C). A probabilidade de sobrevida em adultos ($N = 239$) de acordo com o ARC e número absoluto de linfócitos (ALC / μ L) com TMO censurado (painel de cima) (B) ou não (painel de baixo) (D).

3.5 DISCUSSÃO

A introdução de terapia IS cerca de 30 anos atrás mudou drasticamente o prognóstico para pacientes com AAS; seus benefícios (e limitações) foram quantificados em estudos sistemáticos nos EUA, Japão e Europa (2, 69). Esses estudos mostraram que aproximadamente dois terços dos pacientes atingem uma melhora hematológica e que essa resposta correlaciona com a sobrevida a longo prazo. Para um terço dos pacientes que não respondem, ciclos repetidos de imunossupressão são frequentemente administrados, com taxas variáveis de respostas relatadas (30, 31, 39, 70). Em pacientes que não possuem um doador aparentado histocompatível, o transplante com doadores não aparentado é uma opção com dados de registro mostrando uma sobrevida geral de 50-60% em pacientes de todas as idades, e com resultados melhores em crianças (43, 44, 71). Portanto, na prática clínica, idade é um dos principais fatores usados na decisão entre terapia imunossupressora ou TMO.

Infelizmente, uma resposta favorável à IS não pode ser rotineiramente prevista. A presença de um clone HPN pré-tratamento tem sido sugerida como um marcador de uma resposta favorável para IST em adultos (72). Nos últimos anos, a capacidade de medir uma pequena população de células CD55⁺/CD59⁺ por citometria de fluxo aumentou substancialmente a sensibilidade da detecção de um clone HPN pequeno quando comparado com o teste de Ham mais tradicional (49). A correlação com a resposta, no entanto, não foi confirmada em nosso estudo ou em uma coorte de crianças japonesas (50, 73). A razão para esta discrepância pode ser devido aos diferentes métodos

de determinação da presença de um clone HPN; Sugimori *et al* (72) definiu um clone HPN como GPI-neutrófilos > 0,003% ou GPI- em hemácias > 0,005%; Yoshida *et al* (73) definiu um clone HPN como GPI- em hemácias > 0,037%, e em nossa casuística um clone HPN foi considerado presente quando tanto GPI- em neutrófilos ou células vermelhas foram $\geq 1\%$. Para minimizar heterogeneidade em nossa coorte, a análise foi realizada apenas em pacientes que receberam regimes baseados em h-ATG + CsA com resultados muito semelhantes. Nossos dados mostraram que os pacientes mais jovens têm uma maior probabilidade de resposta à IS quando comparados a pacientes com mais idade. Pacientes com neutropenia muito grave ($ANC < 200 /\mu L$) representam um grupo de alto risco na AAS devido ao risco de infecções potencialmente fatais (74). Em nosso estudo, a contribuição do ANC para a resposta aos seis meses foi devido apenas à relação esperada entre o ANC e sobrevida nos primeiros seis meses (aqueles que não completaram seis meses de terapia IS foram considerados como não respondedor). Quando somente aqueles que completaram os seis meses de IS foram analisados, o efeito da ANC em resposta desapareceu, enquanto que os efeitos da idade, ARC e ALC mantiveram-se preditivo de resposta hematológica e SG.

Em geral, a recuperação em pacientes com anemia aplástica que são tratados com terapia IS envolve a eliminação de clones autorreativos de células T que reconhecem e destroem células-alvo progenitoras na medula óssea, que é seguida por uma recuperação autóloga da hematopoiese. Uma ARC pré-tratamento pode ser um indicador de função medular residual e da

presença de células-tronco suficientes para reconstituição hematopoiética após eliminação do insulto imunológico. Os alvos de medula óssea de ataque imunológico em AAS permanecem ainda desconhecidos, mas é possível que, em pacientes com uma ARC e ALC baixos uma destruição mais pronunciada de elementos de um compartimento hematopoiético mais primitiva ocorreu (afetando tanto as linhas mielóide e linfóide) em comparação, por exemplo, quando ambos ARC e ALC são elevados. A ARC e ALC são dois valores simples que estão prontamente disponíveis em um hemograma de rotina e são amplamente realizadas como um teste automatizado e padronizado, o que minimiza variabilidade de resultados entre diferentes dias e operadores. Alguns resultados laboratoriais de investigação que refletem a fisiopatologia da AAS, tais como a proporção elevada de células T ativadas (65), aumento da expressão de interferon-gama na medula óssea e células T periféricas (66), e a expressão aumentada de proteínas “heat shock” (67) têm sido propostos como úteis no prognóstico. Porém esses métodos não são facilmente disponíveis ou aplicados.

A análise risco-benefício da IS e TMO pode ser melhor avaliada quando a resposta à IST pode ser prevista na AAS. Por exemplo, em pacientes com neutropenia muito grave (e, portanto, um maior risco de mortalidade imediata) e uma baixa probabilidade de resposta, um transplante de doador não aparentado em pacientes mais jovens ou aparentado de um irmão HLA-compatível em pacientes de mais idade poderia ser melhor embasado na clínica.

O nosso estudo é limitado pela sua natureza retrospectiva e o período de tempo que foi utilizado para a análise, 16 anos. No entanto, durante o período de 16 anos, os critérios diagnósticos, de inclusão, de resposta foram os mesmos no NIH. Além do mais, a fonte do ATG e os protocolos de administração do ATG também mantiveram-se inalterados ao longo dos anos. Portanto, os parâmetros preditivos descritos nessa análise podem ser importantes na decisão clínica, particularmente em relação ao momento do transplante, conforme a indicação para o transplante aparentado (agora oferecido aos pacientes mais velhos) e TMO de doadores não aparentados (em pacientes que não têm um irmão HLA-combinado) amplia.

4 ESTUDO “ASSOCIAÇÃO DO COMPRIMENTO TELOMÉRICO EM LEUCÓCITOS MONONUCLEARES COM RECIDIVA HEMATOLÓGICA, TRANSFORMAÇÃO MALIGNA E SOBREVIDA NA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA” (JAMA. 2010;304:1358-64)

4.1 INTRODUÇÃO

A recidiva e evolução clonal para SMD e leucemia limitam o sucesso da terapia IS na AAS. As recidivas são comumente abordadas com mais imunossupressão com resgate hematológico obtido em aproximadamente dois terços dos casos (30). A evolução clonal, que ocorre em 10-15% ao longo termo, é mais problemático sendo o TMO a única abordagem curativa principalmente nos casos de monossomia do 7, cariótipo complexo, SMD de alto risco e nas leucemias (25). Não é sabido o porquê dessas complicações tardias. Especula-se que as recidivas ocorram devido ao controle incompleto do insulto imunológico com sobrevivência de células autorreativas ou que o número de células tronco hematopoiéticas seja insuficientes limitando a sustentação da hematopoese no longo termo. Os fatores que contribuem para a evolução clonal são ainda mais elusivos sendo a pré-existência de clones anormais não detectáveis na citogenética convencional ou alterações cromossômicas, decorrentes de um estresse imunológico persistente ao longo dos anos, possibilidades plausíveis que não foram confirmadas. Devido à incerteza da fisiopatogênica dessas complicações tardias, não há métodos para prever seu aparecimento no momento do diagnóstico da AAS.

Na clínica, essa habilidade teria valor na decisão terapêutica uma vez que em pacientes com risco elevado de recaídas e evolução para SMD, poder-se-iam ter maior benefício a longo termo com o transplante, e àqueles com baixo risco dessas complicações possivelmente maior benefício com terapia IS. Nós hipotetizamos que o comprimento dos telômero em células periféricas mononucleares no momento do diagnóstico pudesse ser um biomarcador que estivesse associado a essas complicações tardias.

Os telômeros são repetições de nucleotídeos nas extremidades dos cromossomas que funcionam como “capas” de proteção que evitam a erosão do DNA genômico durante a divisão celular. O DNA telomérico pode ser alongado pelo complexo da telomerase, que é composto por uma subunidade catalítica da transcriptase reversa (codificada por *TERT*), RNA (codificada por *TERC*), e proteínas associadas (36). O encurtamento dos fins teloméricos levam a senescência replicativa das células, e valores bastante curtos a instabilidade genômica com fusões cromossômicas e fim-a-fim (36, 75-77).

Portanto, é possível que o desgaste dos telômeros na AAS pudesse contribuir para a recidiva (devido à inabilidade replicativa de células progenitoras) e evolução clonal (por instabilidade genômica em telômeros curtos). Para testar essa hipótese, medimos o comprimento dos telômeros pré-tratamento em pacientes consecutivos no NIH que receberam ATG + CsA desde 2000 e analisamos sua relação com a recuperação hematológica, recaída, evolução clonal e sobrevida geral.

4.2 OBJETIVO

Investigar a relação do comprimento telomérico com a resposta hematológica, recidiva, evolução clonal e sobrevida na anemia aplástica severa.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os pacientes foram inscritos em três protocolos clínicos sequenciais de AAS virgem de tratamento entre 2000 e 2008 no NIH. Todos os pacientes consecutivos tratados com ATG + ciclosporina nos quais havia células congeladas suficientes para medida do comprimento telomérico foram incluídos na presente análise. Um total de 248 pacientes foram incluído em protocolos de tratamento durante o período analisado, dos quais 183 foram incluídos na análise. Os motivos para exclusão foram não ser virgem de tratamento (em 19), terapia IS que não ATG + CsA (em 16), e material biológico insuficiente (em 30). Os pacientes (ou responsáveis legais) assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética Pesquisa Institucional do NHLBI, NIH. Para fins de elegibilidade nos protocolos de pesquisa, AAS foi definida como a celularidade da medula óssea < 30% e pancitopenia grave com pelo menos dois dos seguintes critérios no hemograma: 1) ANC inferior a 500 / μ L, 2) ARC inferior a 60 000 / μ L; 3) plaquetas inferior a 20 000 / μ L. Prova de fragilidade cromossômica após estímulo com diepoxibutano e, em alguns casos, também para a mitomicina C foi conduzida a fim de excluir anemia de Fanconi. Pacientes com AAS hereditária ou evidência de alterações clonais na

citogenética da medula óssea foram excluídos do recrutamento para estes protocolos.

Resposta hematológica foi definida como não mais havendo critérios para AAS e foi determinada aos seis meses após terapia IS. Pacientes que recaíram por definição requeriam reinstituição da terapia IS. Evolução clonal foi definida como o aparecimento de um novo clone na citogenética da medula óssea após a terapia IS. Todos os pacientes foram testados para as mutações em genes do complexo da telomerase (*TERT* e *TERC*). Os pacientes foram tratados nos seguintes protocolos: três foram baseadas em h-ATG + CsA e em ATG de coelho (r-ATG) + CsA. Os três regimes de h-ATG foram h-ATG + CsA padrão, h-ATG/CsA + MMF e h-ATG/CsA + sirolimus. Não houve diferença no resultado clínico entre os três esquemas de h-ATG e para propósitos dessa análise, os dados clínicos desses protocolos foram combinados para essa análise.

O comprimento dos telômeros em leucócitos foi quantitativo e medido por reação de polimerase em cadeia (PCR). Leucócitos foram separados por meio de lise de hemácias e o DNA extraído com o kit DNeasy (Qiagen, Valência, Califórnia). O PCR foi realizado no sistema de PCR em tempo real 7500 da Applied Biosystems, Foster City, Califórnia (78, 79). O comprimento telomérico de cada amostra foi baseado na razão do telômero para a cópia de um único gene (razão T:S) com base no cálculo $\Delta C_t [C_t(\text{telômeros}) / C_t(\text{único gene})]$. Comprimento telomérico foi expresso como uma relação T:S, que foi

normalizada para a média da razão T:S de uma 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 como amostra de validação. Os investigadores do laboratório que conduziram o ensaio do comprimento dos telômeros não tiveram acesso aos dados clínicos antes da análise estatística.

4.3.1 Métodos estatísticos

O comprimento telomérico ajustado para a idade foi calculado subtraindo o comprimento telomérico esperado do observado. Os comprimentos teloméricos foram divididos em quartis e seus efeitos na resposta, recidiva, evolução clonal e sobrevida foram analisados usando o modelo de Cox de risco proporcional. Com base nas curvas de sobrevida por quartil para cada um dos eventos clínicos, quartis com probabilidades de eventos semelhantes foram agrupados em análise posterior. Consequentemente, para análise do tempo de evolução clonal e sobrevivência, os pacientes do primeiro quartil formaram um grupo distinto, e os pacientes em quartis 2-4 foram combinados devido a seus resultados clínicos semelhantes. Como a relação entre o comprimento dos telômeros e recidiva foi mais linear, não havia limite aparente que discriminasse aqueles com maior risco dessa complicação. Médias, proporções, e desvios-padrão estratificados por quartis, foram utilizados para descrever a idade dos pacientes, sexo e outras características de base. Os valores de P dos testes de “log-rank” foram utilizados para avaliar os efeitos globais de covariáveis na análise univariada e multivariada de Cox modelos de riscos proporcionais. Os resultados numéricos foram calculados usando o

pacote de software S-PLUS (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Califórnia). Valores de P bicaudal foram usados e considerados estatisticamente significantes se $< 0,05$.

4.4 RESULTADOS

O comprimento telomérico foi medido em um total de 183 pacientes que receberam terapia inicial e categorizados em quartis após ajuste para a idade (Tabela 8). A distribuição etária entre os 4 quartis foi semelhante (Tabela 8). O seguimento mediano em todos os pacientes foi de 55 meses (variando de 0.1-116 meses) e para os pacientes vivos de 64 meses (variando de 6-116 meses).

Na regressão logística multivariada, o comprimento dos telômeros não foi associado com a resposta aos seis meses. Em um modelo multivariado de risco proporcional de Cox, telômeros mais curtos foram associados com a recaída, a evolução clonal e mortalidade (Tabela 9). Avaliada como uma variável contínua, o comprimento dos telômeros foi inversamente associado com recaída; para a evolução clonal e mortalidade, aqueles em quartis de 2 a 4 tiveram uma taxa de cerca de um terço em comparação com o primeiro quartil (Tabela 9).

Cento e quatro pacientes (57%) responderam à terapia IS. Não houve correlação entre o comprimento dos telômeros pré-tratamento e a probabilidade de resposta hematológica. A taxa de resposta de pacientes no primeiro quartil foi de 56,5% (95% IC, 41,6% - 71,4%); no segundo quartil,

54,3% (95% IC, 39,4% - 69,3%); no terceiro quartil, 60% (95% IC, 45,1% - 74,9%) e no quarto quartil, 56,5% (95% IC, 41,6% - 71,4%). Vinte e seis dos 104 pacientes que responderam a um primeiro ciclo de imunoterapia tiveram recaída subsequente com uma taxa de recidiva em seis anos de 26,3% (95% IC, 17% - 34,5%). Entre os respondedores, a taxa de recaídas correlacionou inversamente com o comprimento dos telômeros (Fig. 7). Quando o comprimento dos telômeros foi avaliado como uma variável contínua, a taxa de recidiva aumentou à medida que o comprimento dos telômeros encurtava (HR, 0,16; P = 0,01; Tabela 9). Entre os 9 pacientes que recidivaram nos quartis 3 e 4, 8 foram retratados com imunossupressão, dos quais 6 responderam, e entre os 17 nos quartis 1 e 2, 16 foram retratados com imunossupressão, e 12 responderam. Assim, os telômeros mais curtos foram associados com maior risco de recaída, mas não impediram uma nova recuperação hematológica com o retratamento.

Quando a incidência de evolução clonal e sobrevida foram analisadas por quartil, uma taxa mais elevada foi observada naqueles com telômeros mais curtos (P = 0,02 e P = 0,06, respectivamente). Em análise univariada, aqueles nos quartis de 2 a 4 foram melhor do que aqueles com um comprimento dos telômeros no primeiro quartil que tiveram um maior risco de evolução clonal e mortalidade (Figura 8A e 9A). Quando os quartis que apresentavam uma estimativa similar para cada evento foram agrupados, a incidência cumulativa de evolução ao clonal foi de 8,4% (95% IC, 3,2% -13,3%) para aqueles em quartis de 2 a 4, em comparação com 24,5% (95 % IC, 8,7% - 37,5%) entre

aqueles com menores telômeros no primeiro quartil ($P = 0,009$; Figura 8A). Dos dez pacientes que evoluíram no grupo com comprimento telomérico maior (quartis 2 a 4), quatro apresentaram monossomia 7 (1 paciente desenvolveu $t(12; 13)$ antes de evoluir para monossomia do 7), um adquiriu deleção 13q, um perda do cromossomo Y, um perda de cromossomo 18, um teve $t(6; 14)$, um deleção do cromossomo 3, e um teve anomalias citogenéticas complexas. Dos nove pacientes no grupo de menor telômero (primeiro quartil) que evoluíram, seis apresentaram monossomia 7 (dois pacientes desenvolveram deleção 13q antes da evolução para monossomia 7), um desenvolveu deleção 13q, um teve $t(9; 19)$, e um evoluiu para citogenética complexa. Maior evolução para monossomia 7 ou citogenética complexa foi observada no grupo de telômero menor (primeiro quartil) (18,8%, 95% IC, 3,5% - 31,6%) comparado àqueles com comprimento telomérico nos quartis 2 a 4 (4,5%, 95% IC, 0,5% - 8,2%, $P = 0,002$; Figura 8B). Pior sobrevida foi observada em pacientes com o menor comprimento dos telômeros (primeiro quartil), enquanto as curvas para os quartis restantes demonstravam uma taxa de sobrevida similar. A SG entre os dois grupos diferiu significativamente, com 66% (95% IC, 52,9% - 82,5%) daqueles com telômero mais curto (primeiro quartil) sobrevivendo seis anos, em comparação com 83,8% (95% IC, 77,3% - 90,9%) naqueles com telômero maiores nos quartis de 2 a 4 ($P = 0,008$; Figura 9A). No grupo com telômeros maiores, 12 morreram de complicações da pancitopenia, três morreram depois do TMO, dois de progressão para SMD, um de insuficiência cardíaca, e um em um acidente de trânsito. No grupo dos telômeros mais curtos, três morreram de complicações da pancitopenia, cinco morreram após TMO, três morreram

após clonal evolução, um de falha para prosperar, um de um acidente de trânsito, e um de causas desconhecidas. Entre as 19 mortes no grupo com telômero maior, três ocorreram após recaída ou evolução clonal, e entre as 14 mortes no primeiro quartil, cinco ocorreram após recaída ou evolução clonal.

Tabela 8. Característica dos pacientes

Parametro	Todos os pacientes				Primeiro quartil				Segundo quartil				Terceiro quartil				Quarto quartil				P
	N(%)	Média	SD	N(%)	Média	SD	N(%)	Média	SD	N(%)	Média	SD	N(%)	Média	SD	N(%)	Média	SD	N(%)	SD	
Total	183			46(25)			46(25)			45(25)			45(25)			46(25)			46(25)		
Comprimento telomérico (T/S) (variação)	183	1,23(0,53 -1,93)		46	0,86(0,53 -1,17)		46	1,09(0,78 -1,41)		45	1,33(1,04 -1,67)		45	1,64(1,26 -1,93)		46					
Idade	183	35	1,5	46	37	3,3	46	34	3	45	34	2,9	45	34	3,1	46	34	3,1	46	3,1	0,89
Sexo																					
Masculino	105(57)		3,7	29(63)		7,2	26(57)		7,4	25(56)		7,5	25(54)		7,4	25(54)		7,4	25(54)	7,4	0,84
Feminino	78(43)		3,7	17(37)		7,2	20(44)		7,4	20(44)		7,5	21(47)		7,4	21(47)		7,4	21(47)	7,4	
Imunossupressão																					
H-ATG/CsA	70(38)		3,6	16(35)		7,1	15(33)		7	23(51)		7,5	16(35)		7,1	16(35)		7,1	16(35)	7,1	0,24
H-ATG/CsA/MMF	48(26)		3,3	17(37)		7,2	9(20)		5,9	11(24)		6,5	11(24)		6,4	11(24)		6,4	11(24)	6,4	0,26
H-ATG/CsA/Rapa	35(19)		2,9	5(11)		4,6	11(24)		6,4	8(18)		5,8	11(24)		6,4	11(24)		6,4	11(24)	6,4	0,33
ATG coelho/CsA	30(16)		2,7	8(17)		5,7	11(24)		6,4	3(7)		3,8	8(17)		5,7	8(17)		5,7	8(17)	5,7	0,16
Etnia																					
Branco	91(50)		3,7	23(50)		7,5	24(52)		7,4	25(56)		7,5	19(41)		7,3	19(41)		7,3	19(41)	7,3	0,57
Negro	45(25)		3,2	9(20)		5,9	12(26)		6,5	7(16)		5,5	17(37)		7,2	17(37)		7,2	17(37)	7,2	0,09
Hispano	35(19)		2,9	11(24)		6,4	7(15)		5,4	8(18)		5,8	9(20)		5,9	9(20)		5,9	9(20)	5,9	0,34
Asiático	12(7)		1,8	3(7)		3,7	3(7)		3,7	5(11)		4,7	1(2)		2,2	1(2)		2,2	1(2)	2,2	0,40
Hemograma (µL)																					
ARC		20 464	1 371		24 352	2 820		22 181	3 265		20 158	2 474		15 159	2 177		15 159	2 177		15 159	0,12
ALC		1 312	48		1 328	121		1 285	92		1 322	71		1 313	96		1 313	96		1 313	0,89
ANC		363	22		456	46		382	48		346	35		266	39		266	39		266	0,02
ANC < 200	67(37)		3,6	11(24)	6,4	17(37)		7,2	16(36)		7,2	16(36)		7,5	23(50)		7,5	23(50)		7,5	0,08
Plaquetas		10 852	1 423		9 304	923		9 848	886		14 911	5 519		9 435	1 157		9 435	1 157		9 435	0,67

O comprimento telomérico e mostrado por quartis. H-ATG/CsA, globulina antitumoral de cavalo + ciclosporina; H-ATG/CsA/MMF, globulina antitumoral de cavalo + ciclosporina + micofenolato de mofetila; H-ATG/CsA/Rapa, globulina antitumoral de cavalo + ciclosporina + sirolimus; ARC, contagem absoluta de reticulócitos; ALC, contagem absoluta de linfócito; ANC, contagem absoluta de neutrófilos; HPN, hemoglobinúria paroxística noturna; SD, desvio-padrão. O valor P foi baseado em estatística F e comparou os 4 quartis.

Tabela 9. Análise multivariada do modelo de risco proporcional de Cox para recidiva, evolução clonal e sobrevida.

O comprimento telomérico como variável continua foi utilizado na análise de recidiva devido a relação linear entre o comprimento telomérico e recidiva. Para evolução clonal e sobrevida, telômero curto foi definido como

	Recidiva			Evolução clonal			Sobrevida		
Fator de risco	HR	95% IC	P	HR	95% IC	P	HR	95% IC	P
Comprimento telomérico	0,16	0,03-0,69	0,01	0,29	0,11-0,76	0,01	0,35	0,17-0,73	0,005
Idade (anos)	1,03	1,01-1,05	0,005	1,03	1,00-1,05	0,01	1,03	1,02-1,05	<0,001
ARC (μL)	0,99	0,63-1,55	0,96	1,10	0,55-2,19	0,79	0,63	0,41-0,97	0,03
ALC (μL)	1,31	0,55-3,10	0,54	1,16	0,51-2,66	0,72	0,89	0,48-1,66	0,72
ANC (μL)	1,20	0,67-2,16	0,54	0,70	0,38-1,27	0,24	0,95	0,65-1,38	0,78
Plaquetas (μL)	0,80	0,46-1,38	0,42	0,76	0,45-1,28	0,30	1,11	0,73-1,67	0,63

aquele ajustado para a idade no primeiro quartil, e telômero longo aquele maior que o primeiro quartil (quartis 2-4). Valores transformados em log para ARC, ALC, ANC e plaquetas foram utilizados. ARC, contagem absoluta de reticulócitos; ALC, contagem absoluta de linfócitos; ANC, contagem absoluta de neutrófilos; HR; "hazard ratio"; 95% IC, 95% intervalo de confiança.

Figura 7. Incidência cumulativa de recaída de acordo com o comprimento telomérico pré-tratamento. Incidência de recidiva por quartil. A maior taxa de recidiva foi observado nos quartis menores (quartis 1 e 2) em relação aos quartis maiores, 3 e 4.

Figura 8. Incidência cumulativa da evolução clonal de acordo com o comprimento telomérico pré-tratamento. (A) Incidência de evoluções clonais no primeiro quartil (mais curto) em relação aos quartis 2-4. **(B)** Incidência de monossomia 7 ou citogenética complexas no primeiro quartil (mais curto) em relação aos quartis 2-4.

Figura 9. A sobrevida geral de acordo com o comprimento do telômero e contagem de reticulócitos absoluta (ARC) pré-tratamento. (A) A sobrevida geral de acordo com o pré-tratamento comprimento dos telômeros. Sobrevida geral em 6 anos foi superior naqueles em quartis 2-4 em comparação com os do primeiro quartil (mais curto). **(B)** A sobrevida geral de acordo com o comprimento dos telômeros e ARC pré-tratamento. Um sobrevida favorável foi observada em pacientes com ambos o comprimento telomérico e ARC elevados em comparação com aqueles com um ARC baixo e com telômeros mais curtos (primeiro quartil). Um grupo intermediário com ARC baixo e telômeros mais longos (quartis 2-4) e um ARC alto e com o comprimento mais curto do telômero (primeiro quartil) foi observado, com sobrevida intermediária. A ARC alta foi definida como $\geq 25\,000 / \mu\text{L}$ e ARC baixo $< 25\,000 / \mu\text{L}$.

4.5 DISCUSSÃO

Quando inicialmente descrito, encurtamento telomérico na anemia aplástica se presumia ser secundária a estresse hematopoiético (34). A descoberta da perda de função por mutações em genes do complexo telomerase (*TERC* e *TERT*) estabeleceu uma etiologia genética para desgaste dos telômeros na falência de medula (33, 80). Mutações de genes do complexo da telomerase são etiológico em falências medulas hereditárias, e também, são encontrados em uma minoria de pacientes com anemia aplástica adquirida (34, 80, 81). No entanto, na presente série, apenas 1 paciente testou positivo para uma mutação em *TERT* (códon A202T, comprimento do telômero era inferior ao décimo percentil). Portanto, o presente estudo descreve uma relação entre as variações de comprimento dos telômeros dentro da faixa da normalidade com consequências clínicas importantes na AAS. O comprimento dos telômeros não foi associado com resposta à imunossupressão. O motivo pelo qual alguns pacientes não respondem a terapia IS é desconhecida --- número insuficiente de células-tronco hematopoiéticas, imunossupressão inadequada e uma etiologia não imune tem sido especulada. O fato de que o comprimento telomérico não associou a resposta à imunossupressão indica que este parâmetro não distinguiu um grupo de etiologia não imune. A evolução clonal a SMD é um grande evento adverso na AAS que não pode ser regularmente previsto. Em particular, a monossomia do 7 está associada a um pior prognóstico (29). O presente estudo mostra que o comprimento dos telômeros relaciona-se com

o desenvolvimento de clones de medula anormais, em particular, monossomia 7.

Os principais problemas da terapia imunossupressora na AAS são a refratariedade à IS, recidiva e evolução clonal. A contagem de reticulócitos pré-tratamento foi descrita como preditivo de resposta à IS, no entanto, não existem fatores preditivos para recidiva e evolução clonal (82). No presente estudo, o comprimento dos telômeros pré-tratamento foi associado com recidiva e evolução clonal. Quando a contagem de reticulócitos e comprimento dos telômeros foram combinados nesta coorte, 3 grupos foram observados: 1) um grupo favorável com a contagem de reticulócitos elevada e telômeros mais longos; 2) grupo intermediário com a contagem de reticulócitos elevada e telômeros mais curtos ou vice-versa, e 3) um grupo com risco desfavorável com baixa contagem de reticulócitos e menor comprimento dos telômeros (Figura 9B). ATG + CsA pode ser adequado para o grupo mais favorável, em contraste, melhores regimes são necessários para o grupo de pior risco. Por exemplo, protocolos de maior risco como transplantes em pacientes de mais idade (> 40-50 anos) e fontes alternativas de células-tronco podem ser consideradas no início em pacientes mais jovens.

É possível que a mensuração do comprimento telomérico não seja simplesmente um biomarcador, mas sim um contribuinte para a desestabilização do genoma. Dados *in vitro* e em modelos animais indicam

que o encurtamento dos telômeros provoca instabilidade cromossômica, formação de tumores e progressão do câncer (36, 75-77, 83-88). Em animais "knockout" (*Terc*^{-/-}), aneuploidia e fusões fim-a-fim foram observados em fibroblastos após quatro gerações, sugerindo uma inabilidade de proteger o cromossomo quando a telomerase é insuficiente (89). *In vitro* as células da medula óssea de pacientes com telômeros curto mostraram aumento do número de telômero livres nas extremidades cromossômicas, aneuploidia, e translocações cromossômicas que não foram observados em células de pacientes com telômeros mais longos (88). Clinicamente, o comprimento dos telômeros tem sido associado com câncer em humanos. Na disqueratose congênita, a incidência de câncer é 11 vezes maior do que a da população em geral, com elevadas taxas de tumores malignos da língua e leucemias (90). O telômero tem sido associado a uma variedade de doenças malignas hematológicas e de órgãos sólidos (36, 91, 92). No esôfago de Barrett, aqueles com comprimento telomérico mais curto na sua apresentação apresentaram maior risco de progressão para adenocarcinoma de esôfago (93). Além disso, o comprimento dos telômeros foi um parâmetro preditivo independente de progressão das doenças inflamatórias intestinais para o câncer de colón (94). Em um estudo populacional na Itália, aqueles com comprimento telomérico mais curto apresentavam maior propensão para desenvolver diversos tumores sólidos quando seguidos por dez anos (95).

Nosso estudo é limitado devido à natureza retrospectiva da análise e o número relativamente pequeno de pacientes em cada quartil, o que não

permitiu uma coorte separada de validação. Em sendo um centro quaternário e de pesquisa, a nossa população pode não ser representativa e nossos resultados não necessariamente generalizáveis. Portanto, esses resultados precisam ser reproduzidos para validar a nossa observação e determinar o comprimento telomérico confiáveis a serem incorporados na prática clínica. Porém, a nossa análise também apresenta alguns pontos fortes. A coorte estudada foi homogênea, envolvendo pacientes tratados no contexto de protocolos clínicos de pesquisa com critérios de diagnóstico, terapia IS, cuidados de suporte, e dados clínicos prospectivamente definidos e coletados. Os pacientes são seguidos indefinidamente nos protocolos sendo exigida avaliação periódica de eventos tardios como as recidivas e evoluções clonais.

Em conclusão, nossos dados mostram que em uma coorte de pacientes com AAS tratados com IS, o comprimento dos telômeros não foi associado com a resposta, mas foi associado a risco de recaída, a evolução clonal e SG.

5 CONCLUSÕES

Os estudos apresentados nessa tese sugerem que há parâmetros demográficos e biológicos que podem estar associados à resposta imunossupressora em pacientes com AAS. Essa informação seria valiosa na clínica uma vez que pacientes com baixa probabilidade de resposta e alta probabilidade de recaída e evolução clonal seriam mais beneficiados com TMO como modalidade terapêutica. Em contrapartida, aqueles com probabilidade maior de resposta hematológica à terapia IS poderiam evitar as toxicidades a curto e longo prazos associados ao TMO. O mecanismo pelo qual esses fatores contribuem para o sucesso ou não da terapia IS na AAS não é sabido. É possível que crianças apresentem um reservatório medular maior que pacientes com mais idade obtendo melhora da hematopoiese após controle do insulto autoimune. Os reticulócitos e o comprimento telomérico podem estar associados à reserva medular e “estresse” hematopoiético, respectivamente, contribuindo para a resposta hematológica e complicações tardias na AAS. Algumas dessas observações como o valor preditivo dos reticulócitos já foram reproduzidas em outros estudos retrospectivos com desenho diferente, porém, será importante que a associação do comprimento telomérico com recaída e evolução clonal seja reproduzida em coortes diferentes para melhor entender a importância desse biomarcador com complicações tardias na AAS. A partir daí, pode-se desenvolver cut-off mais precisos a fim de incorporar esse marcador na prática clínica. É provável que a decisão terapêutica nos próximos anos na AAS não dependa somente da

idade e presença de doador aparentado, mas sim de marcadores biológicos que auxiliem na escolha da melhor terapia para cada paciente com AAS.

Os estudos apresentados nessa tese contribuem para a estratificação de risco e melhor alocação de terapias na AAS. Por exemplo, pacientes que apresentam taxas de reticulócitos baixos ao diagnóstico (associado a menor probabilidade de resposta hematológica) e telômeros curtos no primeiro quartil (associado a maior probabilidade de recidiva e evolução clonal) terão menor chance de prover benefício duradouro da terapia imunossupressora. Nesses casos pode-se considerar TMO não aparentado em pacientes mais jovens ou de doador aparentado em pacientes de mais idade (> 40-50 anos) na primeira linha. Em contraponto, aqueles com taxas mais altas de reticulócitos e telômeros mais longos apresentarão maior probabilidade de responder à terapia imunossupressora e não apresentarem eventos tardios (recidiva e evolução clonal) sugerindo que o risco associado ao TMO não se justifica em um primeiro momento ao diagnóstico. Essas informações prognósticas poder-se-ia também ser utilizado após a terapia imunossupressora inicial. Como exemplo, pacientes pediátricos, que apresentam maior taxas de resposta hematológica à terapia imunossupressora, e que não respondem aos 3 meses, pode-se considerar TMO de doador histocompatível não aparentado mais precocemente (antes dos 6 meses) principalmente se o índice de reticulócitos forem baixo ao diagnóstico ou se o comprimento telomérico for baixo (no primeiro quartil) para a idade. Essas informações aplicadas à clínica irão permitir alocação a

terapia de maneira mais racional e reservar os riscos associado ao TMO àqueles pacientes com menor probabilidade de apresentarem benefício em longo termo a terapia imunossupressora.

Os dados provenientes desses estudos vem mais recentemente sendo confirmados em outras coortes e associando a alterações genéticas importantes na evolução clonal na AA. A erosão do comprimento telomérico e seu consequente encurtamento foi identificado como um evento que antecede o aparecimento da monosomia do 7 no aspirado de medula, que esta associado a evolução para síndrome mielodisplásica e leucemia (96). Essa observação corrobora a noção de que o encurtamento telomérico não representa somente um biomarcador de transformação maligna, mas participa desse processo levando a maior instabilidade genética e evolução clonal. Em outra experiência inglesa, o menor comprimento telomérico correlacionou com a presença de mutações somáticas (como mutação nos genes *ASXL1* e *DNMT3A*) que associam com transformação maligna (97). Essa observação é importante uma vez que mutações somáticas foram identificadas em uma grande coorte como sendo mais comuns na anemia aplástica do que previamente suspeitado e em alguns casos associando a evolução para síndrome mielodisplásica e leucemia (98). Com isso, dados que associam a parâmetros favoráveis apos terapia imunossupressora na anemia aplástica vem ficando mais consistentes e robustos e possivelmente em um futuro próximo serão incorporados a algoritmos de tratamento nessa doença uma vez universalmente fatal.

6 REFERÊNCIAS

1. Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D, Young NS. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 1995 Jun 1;85(11):3058-65.
2. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2509-19.
3. Kagan WA, Ascensao JA, Pahwa RN, Hansen JA, Goldstein G, Valera EB, et al. Aplastic anemia: presence in human bone marrow of cells that suppress myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Aug;73(8):2890-4.
4. Zoumbos NC, Gascon P, Djeu JY, Trost SR, Young NS. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 1985 Jan 31;312(5):257-65.
5. 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 May 15;107(10):3983-91.
6. 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 Jul 24-30;364(9431):355-64.

7. Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, Malide D, Keyvanfar K, Visconte V, et al. Deficient CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007 Sep 1;110(5):1603-6.
8. Peffault de Latour R, Visconte V, Takaku T, Wu C, Erie AJ, Sarcon AK, et al. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Blood*. 2010 Aug 23.
9. Chen J, Ellison FM, Eckhaus MA, Smith AL, Keyvanfar K, Calado RT, et al. Minor antigen h60-mediated aplastic anemia is ameliorated by immunosuppression and the infusion of regulatory T cells. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4159-68.
10. Chen J. Animal models for acquired bone marrow failure syndromes. *Clin Med Res*. 2005 May;3(2):102-8.
11. Bloom ML, Wolk AG, Simon-Stoos KL, Bard JS, Chen J, Young NS. A mouse model of lymphocyte infusion-induced bone marrow failure. *Exp Hematol*. 2004 Dec;32(12):1163-72.
12. Omokaro SO, Desierto MJ, Eckhaus MA, Ellison FM, Chen J, Young NS. Lymphocytes with aberrant expression of Fas or Fas ligand attenuate immune bone marrow failure in a mouse model. *J Immunol*. 2009 Mar 15;182(6):3414-22.
13. Lynch RE, Williams DM, Reading JC, Cartwright GE. The prognosis in aplastic anemia. *Blood*. 1975 Apr;45(4):517-28.
14. Sanchez-Medal L, Gomez-Leal A, Duarte L, Guadalupe Rico M. Anabolic androgenic steroids in the treatment of acquired aplastic anemia. *Blood*. 1969 Sep;34(3):283-300.

15. Thomas ED, Storb R, Fefer A, Slichter SJ, Bryant JI, Buckner CD, et al. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet*. 1972 Feb 5;1(7745):284-9.
16. Champlin R, Ho W, Gale RP. Antithymocyte globulin treatment in patients with aplastic anemia: a prospective randomized trial. *N Engl J Med*. 1983 Jan 20;308(3):113-8.
17. Valdez JM, Scheinberg P, Nunez O, Wu CO, Young NS, Walsh TJ. Decreased infection-related mortality and improved survival in severe aplastic anemia in the past two decades. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011 Mar 15;52(6):726-35.
18. Horowitz MM. Current status of allogeneic bone marrow transplantation in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol*. 2000 Jan;37(1):30-42.
19. Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012 Apr 19.
20. Bacigalupo A, Brand R, Oneto R, Bruno B, Socie G, Passweg J, et al. Treatment of acquired severe aplastic anemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy--The European Group for Blood and Marrow Transplantation experience. *Seminars in hematology*. 2000 Jan;37(1):69-80.
21. Passweg JR, Marsh JC. Aplastic anemia: first-line treatment by immunosuppression and sibling marrow transplantation. *Hematology / the*

Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2010;2010:36-42.

22. Frickhofen N, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H, Raghavachar A, Vogt HG, Herrmann F, et al. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporine. The German Aplastic Anemia Study Group. *N Engl J Med*. 1991 May 9;324(19):1297-304.
23. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Choay J, Trolard P, Schneider M, et al. Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphocytic serum. *Br Med J*. 1970 Apr 18;2(5702):131-6.
24. Gluckman E, Marmont A, Speck B, Gordon-Smith EC. Immunosuppressive treatment of aplastic anemia as an alternative treatment for bone marrow transplantation. *Semin Hematol*. 1984 Jan;21(1):11-9.
25. 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 Mar 5;289(9):1130-5.
26. Kojima S, Hibi S, Kosaka Y, Yamamoto M, Tsuchida M, Mugishima H, et al. Immunosuppressive therapy using antithymocyte globulin, cyclosporine, and danazol with or without human granulocyte colony-stimulating factor in children with acquired aplastic anemia. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2049-54.
27. Bacigalupo A, Bruno B, Saracco P, Di Bona E, Locasciulli A, Locatelli F, et al. Antilymphocyte globulin, cyclosporine, prednisolone, and granulocyte colony-stimulating factor for severe aplastic anemia: an update of the GITMO/EBMT study on 100 patients. European Group for Blood and Marrow

Transplantation (EBMT) Working Party on Severe Aplastic Anemia and the Gruppo Italiano Trapianti di Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):1931-4.

28. Fuhrer M, Burdach S, Ebell W, Gadner H, Haas R, Harbott J, et al. Relapse and clonal disease in children with aplastic anemia (AA) after immunosuppressive therapy (IST): the SAA 94 experience. German/Austrian Pediatric Aplastic Anemia Working Group. *Klin Padiatr*. 1998 Jul-Aug;210(4):173-9.

29. Maciejewski JP, Risitano A, Sloand EM, Nunez O, Young NS. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3129-35.

30. 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 Jun;133(6):622-7.

31. Tichelli A, Passweg J, Nissen C, Bargetzi M, Hoffmann T, Wodnar-Filipowicz A, et al. Repeated treatment with horse antilymphocyte globulin for severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 1998 Feb;100(2):393-400.

32. Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3582-92.

33. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2005 Apr 7;352(14):1413-24.

34. Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*. 2008 May 1;111(9):4446-55.
35. Calado RT, Graf SA, Wilkerson KL, Kajigaya S, Ancliff PJ, Dror Y, et al. Mutations in the SBDS gene in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1141-6.
36. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med*. 2009 Dec 10;361(24):2353-65.
37. Feldser DM, Greider CW. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer cell*. 2007 May;11(5):461-9.
38. Hao LY, Armanios M, Strong MA, Karim B, Feldser DM, Huso D, et al. Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity. *Cell*. 2005 Dec 16;123(6):1121-31.
39. 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 Nov;107(2):330-4.
40. Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Wu CO, Young NS. Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naive, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):345-54.

41. Townsley DM, Dumitriu B, Kajigaya S, Calado RT, Scheinberg P, Young NS. Clinical and Genetic Heterogeneity of Telomere Diseases. ASH Annual Meeting Abstracts. 2012 November 16, 2012;120(21):2373-.
42. Gupta V, Eapen M, Brazauskas R, Carreras J, Aljurf M, Gale RP, et al. Impact of age on outcomes after transplantation for acquired aplastic anemia using HLA-identical sibling donors. *Haematologica*. 2010 September 17, 2010;haematol.2010.026682.
43. Passweg JR, Perez WS, Eapen M, Camitta BM, Gluckman E, Hinterberger W, et al. Bone marrow transplants from mismatched related and unrelated donors for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Apr;37(7):641-9.
44. Deeg HJ, O'Donnell M, Tolar J, Agarwal R, Harris RE, Feig SA, et al. Optimization of conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with aplastic anemia after failure of immunosuppressive therapy. *Blood*. 2006 Sep 1;108(5):1485-91.
45. Kennedy-Nasser AA, Leung KS, Mahajan A, Weiss HL, Arce JA, Gottschalk S, et al. Comparable outcomes of matched-related and alternative donor stem cell transplantation for pediatric severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Dec;12(12):1277-84.
46. 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. *Haematologica*. 2010 June 1, 2010;95(6):976-82.

47. 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 Aug 1;100(3):799-803.
48. Maury S, Balere-Appert ML, Chir Z, Boiron JM, Galambrun C, Yakouben K, et al. Unrelated stem cell transplantation for severe acquired aplastic anemia: improved outcome in the era of high-resolution HLA matching between donor and recipient. *Haematologica*. 2007 May;92(5):589-96.
49. Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Boccuni P, Nagakura S, Green SW, Kirby MR, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med*. 1999 Sep 21;131(6):401-8.
50. Scheinberg P, Marte M, Nunez O, Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. *Haematologica*. 2010 Jul;95(7):1075-80.
51. Scheinberg P, Nunez O, Wu C, Young NS. Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclosporin and mycophenolate mofetil. *Br J Haematol*. 2006 Jun;133(6):606-11.
52. 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 Mar;94(3):348-54.

53. Bayever E, Champlin R, Ho W, Lenarsky C, Storch S, Ladisch S, et al. Comparison between bone marrow transplantation and antithymocyte globulin in treatment of young patients with severe aplastic anemia. *J Pediatr*. 1984 Dec;105(6):920-5.
54. Halperin DS, Grisaru D, Freedman MH, Saunders EF. Severe acquired aplastic anemia in children: 11-year experience with bone marrow transplantation and immunosuppressive therapy. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1989 Fall;11(3):304-9.
55. Locasciulli A, van't Veer L, Bacigalupo A, Hows J, Van Lint MT, Gluckman E, et al. Treatment with marrow transplantation or immunosuppression of childhood acquired severe aplastic anemia: a report from the EBMT SAA Working Party. *Bone Marrow Transplant*. 1990 Sep;6(3):211-7.
56. Fuhrer 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 Sep 15;106(6):2102-4.
57. 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 May;133(3):305-14.
58. Sanders JE, Woolfrey AE, Carpenter PA, Storer BE, Hoffmeister PA, Deeg HJ, et al. Late effects among pediatric patients followed for nearly 4

decades after transplantation for severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Aug 4;118(5):1421-8.

59. Deeg HJ, Leisenring W, Storb R, Nims J, Flowers ME, Witherspoon RP, et al. Long-term outcome after marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3637-45.

60. Te Velde J, Haak HL. Aplastic anaemia. Histological investigation of methacrylate embedded bone marrow biopsy specimens; correlation with survival after conventional treatment in 15 adult patients. *Br J Haematol*. 1977 Jan;35(1):61-9.

61. Williams DM, Lynch RE, Cartwright GE. Prognostic factors in aplastic anaemia. *Clin Haematol*. 1978 Oct;7(3):467-74.

62. Najean Y, Pecking A. Prognostic factors in acquired aplastic anemia. A study of 352 cases. *Am J Med*. 1979 Oct;67(4):564-71.

63. Rozman C, Marin P, Granena A, Nomdedeu B, Montserrat E, Feliu E, et al. Prognosis in acquired aplastic anaemia. A multivariate statistical analysis of 80 cases. *Scand J Haematol*. 1981 Apr;26(4):321-9.

64. Hormann A, Berchthold W, Rhyner K, Wiedemann-Sigg C, Gmur J. Prognosis in acquired aplastic anemia. *Acta Haematol*. 1984;71(2):81-9.

65. Verma A, Deb DK, Sassano A, Kambhampati S, Wickrema A, Uddin S, et al. Cutting edge: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway mediates cytokine-induced hemopoietic suppression in aplastic anemia. *J Immunol*. 2002 Jun 15;168(12):5984-8.

66. Sloan E, Kim S, Maciejewski JP, Tisdale J, Follmann D, Young NS. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by

flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1185-91.

67. Takami A, Nakao S, Tatsumi Y, Wang H, Weihua Z, Yamazaki H, et al. High inducibility of heat shock protein 72 (hsp72) in peripheral blood mononuclear cells of aplastic anaemia patients: a reliable marker of immune-mediated aplastic anaemia responsive to cyclosporine therapy. *Br J Haematol*. 1999 Aug;106(2):377-84.

68. 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 Dec;153(6):814-9.

69. Young NS, Scheinberg P, Calado RT. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol*. 2008 May;15(3):162-8.

70. Means RT, Jr., Krantz SB, Dessypris EN, Lukens JN, Niblack GD, Greer JP, et al. Re-treatment of aplastic anemia with antithymocyte globulin or antilymphocyte serum. *Am J Med*. 1988 Apr;84(4):678-82.

71. Margolis DA, Casper JT. Alternative-donor hematopoietic stem-cell transplantation for severe aplastic anemia. *Semin Hematol*. 2000 Jan;37(1):43-55.

72. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1308-14.

73. Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, Yamamoto T, Liang J, Wang Y, et al. Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal

nocturnal haemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(3):427-35.

74. Valdez JM, Scheinberg P, Nunez O, Wu CO, Young NS, Walsh TJ. Decreased infection-related mortality and improved survival in severe aplastic anemia in the past two decades. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010 Mar;52(6):726-35.

75. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):9-18.

76. Rossi D, Lobetti Bodoni C, Genuardi E, Monitillo L, Drandi D, Cerri M, et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1062-72.

77. Svenson U, Ljungberg B, Roos G. Telomere length in peripheral blood predicts survival in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):2896-901.

78. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 15;30(10):e47.

79. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet*. 2007 Jan 13;369(9556):107-14.

80. Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*. 2001 Sep 27;413(6854):432-5.
81. Fogarty PF, 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. *The Lancet*. 2003;362(9396):1628-30.
82. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2009 Jan;144(2):206-16.
83. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 1990 Aug 30;346(6287):866-8.
84. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1997 Nov;3(11):1931-41.
85. Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, et al. Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6405-9.
86. O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, Finley JC, Shen WT, Emerson S, et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet*. 2002 Oct;32(2):280-4.
87. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability

is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 1992 May;11(5):1921-9.

88. Calado RT, Cooper JN, Padilla-Nash HM, Sloand EM, Wu CO, Scheinberg P, et al. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia. *Leukemia.* 2012 Apr;26(4):700-7.

89. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 1997 Oct 3;91(1):25-34.

90. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood.* 2009 Jun 25;113(26):6549-57.

91. Jones CH, Pepper C, Baird DM. Telomere dysfunction and its role in haematological cancer. *Br J Haematol.* 2012 Mar;156(5):573-87.

92. Calado RT, Regal JA, Hills M, Yewdell WT, Dalmazzo LF, Zago MA, et al. Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jan 27;106(4):1187-92.

93. Risques RA, Vaughan TL, Li X, Odze RD, Blount PL, Ayub K, et al. Leukocyte telomere length predicts cancer risk in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Dec;16(12):2649-55.

94. Risques RA, Lai LA, Brentnall TA, Li L, Feng Z, Gallaher J, et al. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterology.* 2008 Aug;135(2):410-8.

95. Willeit P, Willeit J, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Brandstatter A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA*. 2010 Jul 7;304(1):69-75.
96. Dumitriu B, Feng X, Townsley DM, Ueda Y, Yoshizato T, Calado RT, et al. Telomere attrition and candidate gene mutations preceding monosomy 7 in aplastic anemia. *Blood*. 2015 Jan 22;125(4):706-9.
97. Kulasekararaj AG, Jiang J, Smith AE, Mohamedali AM, Mian S, Gandhi S, et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2014 Oct 23;124(17):2698-704.
98. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2015 Jul 2;373(1):35-47.