



MARA CABRAL MORAES

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INFUSÃO
DE LINFÓCITOS DO DOADOR (ILD) EM
PACIENTES ONCO-HEMATOLÓGICOS APÓS
TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS (TCTH) ALOGÊNICO**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARA CABRAL MORAES

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INFUSÃO DE
LINFÓCITOS DO DOADOR (ILD) EM PACIENTES ONCO-
HEMATOLÓGICOS APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH) ALOGÊNICO**

Orientador(a): Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Junior

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade de Campinas para
obtenção de título de Mestra em Clínica Médica, área de
concentração Clínica Médica.*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA MARA CÂBRAL MORAES E
ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSÉ
FRANCISCO COMENALLI MARQUES JUNIOR**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M791c

Moraes, Mara Cabral, 1977-

Contribuição ao estudo da infusão de linfócitos do doador (ILD) em pacientes onco-hematológicos após transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico / Mara Cabral Moraes. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : José Francisco Comenalli Marques Junior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Linfócitos. 2. Transplante de células tronco. 3. Doença enxerto-hospedeiro. 4. Efeito enxerto vs tumor. 5. Recidiva. I. Marques Junior, Jose Francisco Comenalli. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Contribution to donor lymphocyte infusion study in hematologic cancer patients after allogeneic hematopoietic stem cell (HSCT) transplantation.

Palavras-chave em inglês:

Lymphocytes

Stem cell transplantation

Graft vs host disease

Graft vs tumor effect

Recurrence

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

José Francisco Comenalli Marques Junior [Orientador]

Cármio Antonio de Souza

Milton Arthur Ruiz

Data da defesa: 29-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Mara Cabral Moraes

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Junior

Membros:

1. Prof. Dr. Milton Artur Ruiz

2. Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

3. Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Junior

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/08/2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço as equipes de Transplante e Aférese do Hemocentro da UNICAMP que coletaram e forneceram as informações que tornaram este trabalho possível. Agradeço a meu orientador pela paciência, dedicação e disponibilidade, sempre presentes durante todos esses anos. A Arlete por me representar quando não pude estar presente e pela ajuda nas correções do trabalho. A meus colegas de trabalho que me apoiaram e ajudaram quando precisei me ausentar. A meus pais e irmãos pelo exemplo e apoio. A meu marido pela ajuda e compreensão em todos os momentos em que precisei me ausentar, sem ele este trabalho não seria possível. E a minha filha, sempre com um sorriso, dando-me forças para seguir em frente.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A ILD vem sendo utilizada como opção terapêutica para recaída de neoplasias hematológicas após transplante alogênico. Contudo, este procedimento não é isento de riscos e sua indicação deve ser criteriosa. Neste trabalho avaliamos a ILD quanto à eficácia da coleta; efeitos adversos para os doadores e pacientes e efeitos quanto à remissão da doença, redução de recaída e mortalidade.

MÉTODOS: Foi realizado estudo retrospectivo dos pacientes (n=40) que receberam ILD, no Hemocentro da UNICAMP, de março 1995 a janeiro 2008, e dos respectivos doadores (n=40). As características dos pacientes, complicações e sobrevida foram comparadas a um grupo de pacientes (n=264) que realizou transplante alogênico e não recebeu ILD.

RESULTADOS: As 54 coletas de linfócitos analisadas atingiram o alvo estabelecido de 10^7 CD3+/Kg receptor, sem nenhuma reação grave para os doadores. Não observamos diferença estatística na mortalidade ($p=0,85$) ou incidência de DECHa ($p=0,231$) entre os grupos de pacientes. No entanto, as causas de óbito foram diferentes ($p<0,001$), com maior mortalidade por doença no grupo em estudo e por outras causas no grupo comparativo. A incidência de DECHc e remissão completa foram maiores no grupo comparativo ($p<0,001$), enquanto o tempo para o óbito foi maior no grupo em estudo ($p=0,009$).

CONCLUSÕES: A coleta de linfócitos foi eficaz e segura para o doador. Para os pacientes a DECH se sobressaiu como efeito adverso, sem aumento após a ILD. Não foi observado aumento na remissão da doença ou queda na mortalidade após a ILD, contudo, o tempo para o óbito foi maior. Outros fatores e a heterogeneidade das amostras podem ter contribuído para os resultados encontrados.

ABSTRACT

BACKGROUND: Donor lymphocyte infusion (DLI) has been used as a therapeutic option for hematological recurrences after allogeneic transplantation. However, this procedure is not devoid of risks and its indication must be precise. In this article we assess DLI regarding collection efficacy; adverse effects in donors and patients and its impact on disease remission, recurrence induction and mortality.

METHODS: A retrospective study of patients (n=40) who received DLI and their respective donors was performed at Hemocentro, UNICAMP, between March 1995 and January 2008. Patient characteristics, complications and survival were compared to a comparative group (n=264) consisting of patients who underwent allogeneic transplantation, but did not receive DLI.

RESULTS: All the 54 lymphocyte collection procedures reviewed reached the set target of 10^7 CD3+/Kg receptor, with no serious adverse reactions to the donors. We did not observe statistical difference in mortality ($p=0.85$) nor in the incidence of acute GVHD ($p=0.231$) between the two patient groups. However, causes of death were statistically different ($p<0.001$), with a higher disease-related mortality rate in the study group and for other causes in the comparative group. Chronic GVHD incidence and complete remission were higher in the comparative group ($p<0.001$), while the overall survival was longer in the study group ($p=0.008$).

CONCLUSIONS: Lymphocyte collection was efficient and safe to the donor. As for patients, GVHD was the most important side effect but did not have a higher incidence after DLI. We did not observe an increase in disease remission or decrease in mortality rate after DLI; however, overall survival was longer. Other factors and the sample heterogeneity might have contributed to the results observed.

LISTA DE ABREVIATURAS

DECH	–	Doença de enxerto contra o hospedeiro.
DECHa	–	Doença de enxerto contra o hospedeiro aguda.
DECHc	–	Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.
EVL	–	Efeito enxerto versus leucemia.
EVT	–	Efeito enxerto versus tumor.
G-CSF	–	Fator estimulador de colônia de granulócitos.
ILD	–	Infusão de linfócitos do doador.
LH	–	Linfoma de Hodgkin.
LLA	–	Leucemia linfóide aguda.
LMA	–	Leucemia mielóide aguda.
LMC	–	Leucemia mielóide crônica.
LNH	–	Linfoma não Hodgkin.
MM	–	Mieloma múltiplo.
MO	–	Medula óssea.
TCTH	–	Transplante de células tronco hematopoiéticas.

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 1: Hemoglobina (pré – pós) procedimento.....	42
Gráfico 2: Leucócitos (pré – pós) procedimento.....	43
Gráfico 3: Plaquetas (pré – pós) procedimento.	43
Gráfico 4: Hemoglobina (pré – pós) procedimento. Grupo com 1 procedimento.	44
Gráfico 5: Leucócitos (pré – pós) procedimento. Grupo com 1 procedimento.	44
Gráfico 6: Plaquetas (pré – pós) procedimento. Grupo com 1 procedimento.	45
Gráfico 7: Porcentagem de queda hemoglobina, leucócitos e plaquetas.....	46
Gráfico 8: Porcentagem de queda hemoglobina, leucócitos e plaquetas. Grupo com 1 procedimento.....	46
Gráfico 9: Tempo para o óbito : grupo em estudo x grupo comparativo.	59

LISTA TABELAS

Tabela 1: Número de pacientes por diagnóstico.....	35
Tabela 2: Número de pacientes por diagnóstico - grupo comparativo.....	37
Tabela 3: Número de procedimentos de coleta e porcentagem por equipamento.	40
Tabela 4: Valores de hemoglobina, leucócitos e plaquetas pré e pós coleta de linfócitos.	42
Tabela 5: Status da doença na indicação ao TCTH.	48
Tabela 6: Status da doença no último seguimento.	50
Tabela 7: Causas de óbito.	51
Tabela 8: Status da doença no último acompanhamento depois de excluídos os óbitos..	52
Tabela 9: Grupo comparativo - “Status” da doença ao TCTH	53
Tabela 10: Grupo comparativo – “Status” da doença no seguimento.....	54
Tabela 11: Grupo comparativo - Causas de óbito.	56
Tabela 12: Grupo comparativo - “Status” da doença no último acompanhamento depois de excluídos os óbitos.	57
Tabela 13: Análise estatística.	60

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA TABELAS.....	xvii
SUMÁRIO	xix
INTRODUÇÃO.....	21
Coleta de linfócitos.....	28
OBJETIVOS.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
Estudo	34
Doadores.....	34
Procedimento de coleta de linfócitos	34
Pacientes	35
Classificação	35
“Status” da doença.....	36
Recaída.....	36
Falha de indução.....	36
Quimera completa.....	36
Quimera mista.....	36
Falha de Pega.....	37
Indicação da infusão de linfócitos	37
Grupo comparativo.....	37
Análise estatística	38
RESULTADOS	39
1. Efeitos adversos da coleta de linfócitos para os doadores.....	40
2. Eficiência do método de coleta	47
3. Pacientes.....	47
⇒ Descrição dos pacientes.....	47
⇒ Efeitos da infusão nos pacientes	49
■ Doença enxerto contra o hospedeiro	49
■ Aplasia de medula óssea	49
■ Sobrevida	50
4. Grupo comparativo	53
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	79

INTRODUÇÃO

Nos últimos 35 anos o transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico do sangue periférico ou da medula óssea (MO) tem emergido como uma terapia eficaz e potencialmente curativa para uma variedade de neoplasias hematológicas resistentes ao tratamento medicamentoso, quando se dispõe de um doador compatível [1,2].

Este sucesso resulta da associação de citorredução, provocada por quimioterapia e/ou radioterapia em altas doses, imunossupressão do receptor, permitindo a pega do enxerto e o efeito enxerto versus tumor (EVT), mediado por linfócitos imunocompetentes do doador presentes no tecido transplantado [3].

Infelizmente, a recaída permanece como a principal causa de falha dessa modalidade de tratamento, sendo o principal fator de risco o tipo de doença. Assim, a taxa de recaída pode variar entre 10 e 30% em pacientes com Leucemia mielóide crônica (LMC) em fase crônica ou Leucemia Aguda em primeira remissão, a valores ainda maiores em pacientes com LMC em fases mais avançadas ou com outras neoplasias [4,5,6]. No passado, um segundo transplante era a única opção curativa para esses pacientes, contudo, à custa de elevada morbidade, mortalidade e, ainda, mantendo altas taxas de recaída [4,6].

A compreensão dos mecanismos de cura pelo transplante alogênico, associada à necessidade de outra opção terapêutica para os pacientes que recaem após o transplante, tem sido críticas no desenvolvimento de novas terapias destinadas a utilizar o sistema imune em benefício clínico.

Desde 1969 tentativas de influenciar o crescimento da leucemia por meio de manipulação imune tem sido descritas [7]. Em 1990 Kolb et al demonstraram a capacidade de linfócitos alogênicos mediar um efeito anti-tumor (efeito EVT). Eles descreveram três pacientes com recaída de LMC após o transplante alogênico, que atingiram remissão hematológica, citogenética e molecular completa após infusão de linfócitos alogênicos do mesmo doador do transplante original [6,8].

Este efeito EVT resulta da ação de células T citotóxicas derivadas do doador, contra antígenos tumorais. Contudo, ainda não foi possível a identificação desses

antígenos e, até o momento, o único alvo do efeito EVT identificado são os antígenos menores de histocompatibilidade [9]. Antígenos normais superexpressos, ou antígenos associados ao tumor, resultantes da expressão de antígenos onco-fetais ou fusão de proteínas, também podem estar envolvidos neste processo [10].

A partir de então, vários estudos demonstraram a eficácia da infusão de linfócitos do doador (ILD) para tratamento de LMC e outras neoplasias hematológicas em recaída após transplante alogênico [11,12,13,14,15,16,17,18,19].

Esses estudos permitiram não apenas confirmar a existência de um efeito EVT, mas também observar que esse efeito seria específico para cada tipo de doença. A causa para esta especificidade ainda não está clara, mas é possível que as células efetoras do efeito EVT reconheçam antígenos tumorais específicos. Outra possibilidade seria que outros parâmetros imunológicos das células alvo, como sua capacidade de apresentar antígenos, a presença de moléculas co-estimulatórias e a taxa de crescimento celular seriam importantes para determinar a magnitude e especificidade do efeito EVT [20].

Todas essas descobertas permitiram solucionar outro problema relacionado ao transplante alogênico: a elevada taxa de morbidade e mortalidade secundária ao regime de condicionamento mieloablativo, restringindo o tratamento a pacientes com idade e condições clínicas favoráveis. Com a descoberta do efeito EVT tornou-se possível reduzir a intensidade do regime de condicionamento, tornando o transplante acessível a mais pacientes. Surge assim, o transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico com regime de condicionamento de intensidade reduzida, cujo sucesso depende da pega inicial do enxerto e indução de tolerância no receptor, de forma a propiciar um meio adequado ao subsequente EVT, a partir da retirada precoce da imunossupressão após o transplante ou através da ILD [21,22].

Dessa forma, a ILD se estabelece como uma opção para prevenção ou tratamento de recaída após transplante de células tronco hematopoiéticas

alogênico, assim como para indução de quimera completa, eliminação de doença residual mínima ou falha em atingir a remissão completa em transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico (TCTH) com regime de condicionamento de intensidade reduzida [21].

Outra indicação de ILD, ainda em estudo, seria o tratamento de complicações do transplante alogênico causadas pelo mau funcionamento do sistema imune após o transplante, ou seja, infecções e malignidades. As desordens linfoproliferativas de células B relacionadas ao vírus Epstein-Barr e as infecções por citomegalovírus são os principais representantes deste grupo [20].

Apesar de todos esses avanços, a ILD não é um tratamento isento de complicações, sendo as principais a doença enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa), a doença enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) e a aplasia de medula [23].

A doença enxerto contra o hospedeiro (DECH) resulta da ação dos linfócitos citotóxicos contra os antígenos menores de histocompatibilidade compartilhados pelas células malignas e os tecidos do receptor. A DECHa grau II - IV e crônica extensa foi observada em 10 a 48% e 11 a 41% dos pacientes, respectivamente, e existe uma forte associação entre essa complicação, o efeito EVT e a taxa de resposta ao tratamento [1,2,4,19].

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento da DECH, dentre eles o diagnóstico de base, o estágio da doença, a dose e tipos de células infundidas, o momento da infusão e o grau de parentesco doador-receptor [23].

Em geral, a DECH observada após ILD é de intensidade leve a moderada e responsiva a terapia imunossupressora, porém, em alguns casos pode ser severa, e tem contribuído para o óbito em até 10% dos pacientes que receberam ILD [24].

Este efeito tóxico da DECH parece ser maior quanto mais próximo do transplante é a infusão. Nesta situação o efeito tóxico seria exacerbado pela presença de citocinas inflamatórias, resultantes do dano tecidual causado pelo regime de condicionamento, infecções e outros insultos fisiológicos [25].

Clinicamente é difícil separar o efeito EVT desejado, da toxicidade do DECH. Uma possibilidade seria identificar as células efectoras, separar estas células, realizar depleção seletiva das células efectoras do efeito DECH e infusão das células efectoras do efeito EVT. Contudo, a identificação dessas células ainda não foi possível [1].

Aparentemente, as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ exercem papéis diferentes nesta situação [1]. Estudos recentes levantam a hipótese de que as células T CD4⁺ desempenham um papel central na indução do efeito EVT enquanto as células T CD8⁺ seriam primordiais no efeito DECH [26].

Células T CD4⁺, isoladas de indivíduos após transplante alogênico, demonstraram capacidade de lisar células leucêmicas criopreservadas, porém, em alguns casos, essas células apresentaram, além de atividade antileucêmica, ação contra os antígenos específicos do complexo de histocompatibilidade implicados no efeito DECH [20].

Giralt et al observaram que a depleção seletiva de linfócitos T CD8⁺, reduz significativamente a taxa de DECH sem aumentar o risco de recaída [27]. Sugeriram, assim, que as células T CD8⁺ seriam as principais efectoras do efeito DECH.

Por outro lado, outro estudo demonstrou que o efeito EVT é mantido após inativação dos linfócitos T CD4⁺ com anticorpos monoclonais anti-CD4, enquanto a inativação dos linfócitos T CD8⁺ resultou em perda do efeito, sugerindo que os linfócitos T CD 8⁺, e não os linfócitos T CD4⁺, seriam os principais indutores do efeito EVT [28].

Além disso, outros subtipos celulares podem estar envolvidos na indução e manutenção do efeito EVT. Estudos com depleção de células T alloreativas CD25⁺, CD69⁺ e CD95⁺ também foram realizados na tentativa de reduzir o efeito DECH, preservando a reatividade do linfócito contra os antígenos tumorais e virais. Contudo, depleção associada de células T reguladoras e perda parcial da especificidade das células T aos antígenos virais e tumorais foram observadas [10,29,30].

Todos esses estudos demonstram a importância das células T no efeito EVT. Contudo, ainda não está claro se o efeito EVT e o efeito DECH são mediados por populações celulares distintas e se é possível, na clínica, separá-los [20]. Parece que vários componentes do sistema imune estão envolvidos e, dependendo da espécie, do tipo de tumor e da incompatibilidade doador-receptor, a natureza da célula efetora do efeito EVT pode variar amplamente [31].

As citocinas e fatores de crescimento também desempenham um papel importante no desenvolvimento e manifestações da DECH. Aparentemente, as citocinas do tipo I, como a interleucina 2 e o interferon gama, promovem o desenvolvimento da DECH, enquanto as citocinas do tipo II, incluindo a interleucina 4 e a interleucina 10, suprimem esse efeito. Contudo, novamente os dados são controversos [32,33,34,35,36,37].

Alguns autores observaram que o risco de desenvolver DECH apresenta correlação com a dose de linfócitos infundida. A partir dessa informação outra estratégia utilizada na tentativa de minimizar o risco de DECH foi o escalonamento da dose de linfócitos, iniciando com doses baixas, de forma a se tentar obter o efeito EVT antes que a dose seja suficiente para causar a DECH [38].

Os primeiros estudos utilizaram doses em torno de 10^8 células T/Kg do receptor, em uma única infusão. Após a observação da elevada incidência de DECH, alguns autores propuseram o uso de escalonamento, começando a infusão com doses baixas, entre 10^5 e 10^7 , e infusões adicionais subsequentes, conforme a resposta clínica. Este esquema resultou em menor incidência de DECH, sem alteração significativa na taxa de resposta e sobrevida livre de doença [3,22,38,39,40].

Contudo, Dazzi et al sugeriram que a menor incidência de DECH após a infusão de linfócitos em doses escalonadas, quando comparada à infusão de linfócitos em dose única, estaria mais relacionada ao fato de os linfócitos serem administrados ao longo de um período maior do que a dose total de linfócitos infundida [4,39].

Até o momento não foi identificada uma dose ideal a ser infundida, a frequência das infusões, o número total de infusões necessárias e o melhor momento para sua realização. Aparentemente, a dose ideal se correlaciona com o estágio da doença e o tipo de doador, apresentando resposta mais precoce em pacientes em recaída molecular ou citogenética (73%) e pacientes com doadores não aparentados (73%), quando comparados a pacientes em recaída hematológica (27%) ou com doadores aparentados (46%) [4]. Por enquanto, a escolha da dose é baseada apenas em observação da resposta clínica e da incidência de DECH [41].

Outra estratégia para minimizar o risco de DECH se baseia no fato dos tecidos expressarem antígenos de histocompatibilidade diferentes. O alvo do efeito DECH são os antígenos menores de histocompatibilidade, que apresentam distribuição tecidual ampla, incluindo pele, fígado e trato gastrointestinal [9]. A identificação de antígenos menores de histocompatibilidade restritos ao tecido hematopoiético, seguida da geração de clones de linfócitos específicos a estes antígenos, permitiria limitar o efeito DECH ao tecido linfohematopoiético. Contudo, os estudos realizados até o momento não observaram essa resposta [1].

Outra estratégia seria a inserção de um “gene suicida” nas células T “*ex vivo*” antes da infusão, e posterior indução farmacológica de morte destas células após o efeito terapêutico ter sido alcançado [1]. Em um estudo foi introduzido nos linfócitos do doador o gene da timidina cinase do vírus herpes simples, que confere ao linfócito sensibilidade à droga Ganciclovir. Assim, quando do desenvolvimento da DECH, esta droga foi utilizada, com consequente morte desses linfócitos e supressão desta complicação [42]. Essa resposta está agora sendo testada em estudos clínicos maiores.

A incidência de aplasia após ILD não está bem documentada, mas alguns autores observaram ser em torno de 17 a 50%. Sua causa seria a destruição das células hematopoiéticas do receptor antes da recuperação da hematopoiese. É geralmente de leve intensidade e transitória, contudo, alguns pacientes apresentam neutropenia absoluta grave, além de necessitarem de transfusões de

hemácias e plaquetas [20]. Sua duração está associada, portanto, ao aumento do risco de infecção e da necessidade transfusional [43].

Os pacientes que falham em recuperar da aplasia após uma a duas semanas podem ser tratados com fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF). Em caso de falha de resposta ao G-CSF, esses pacientes podem ser considerados candidatos à nova infusão de células tronco hematopoiéticas, com depleção de células T, para evitar o risco de induzir DECH. Contudo, alguns pacientes falham também em responder à infusão de células tronco e a mortalidade relacionada à aplasia pode chegar a 4% dos casos [1].

Coleta de linfócitos

O procedimento de ILD consiste na coleta de linfócitos do mesmo doador do transplante alogênico, por meio de linfocitaférese e infusão no paciente, de uma dose específica de células T CD3+, sem a necessidade de fracionar qualquer subtipo celular [2].

A população de células mononucleares periférica é composta por linfócitos T e B, monócitos e células tronco hematopoiéticas. A especificidade do procedimento de aférese em relação às diversas subpopulações depende das suas quantidades presentes no sangue periférico, do volume de sangue total processado e da programação no equipamento utilizado [23].

A concentração periférica dos diferentes subtipos de linfócitos é uma variável biológica que não pode ser prevista para os diversos doadores individualmente. Contudo, o número de linfócitos presentes no sangue periférico disponível para coleta por aférese pode ser estimado a partir da concentração da célula de interesse e do volume sanguíneo do doador [23].

Sato et al demonstraram uma correlação linear entre o volume de sangue processado e o número de células CD3⁺ coletadas. Este achado permitiria estimar o volume mínimo de sangue a ser processado, independente da diferença de resposta entre os doadores [44]. Shaz et al utilizaram essa correlação linear para

determinar o volume de sangue a ser processado. O número de células CD3+ foi suficiente em todas as coletas e resultou em menor tempo de coleta e menor descarte de produtos não utilizados [45].

A estimulação do doador antes do procedimento com fator de crescimento foi utilizada no passado como uma forma de aumentar a quantidade de células CD3+ circulantes, aumentando assim o número de células coletadas por procedimento [46].

Arat et al e Korbling et al observaram que o fator de crescimento administrado pré-coleta está associado a um aumento de 2 a 3 vezes da quantidade de linfócitos CD3+ coletados e de até 26 vezes o número de células T CD34+ coletadas, sem relação com a dose do fator de crescimento administrada, de 5, 10 ou 12 mcg/Kg/dia por 5 dias. Contudo, a quantidade de células CD3+ necessárias para induzir um efeito EVL, após transplante de células tronco hematopoiéticas, em torno de 1×10^8 /Kg do receptor, foi atingida em todos os doadores analisados cuja coleta ocorreu sem estímulo prévio. Assim, o aumento do número de linfócitos coletados não apresenta, portanto, significado clínico e não há indicação do uso de fator de crescimento pré-coleta de linfócitos, exceto quando é necessária maior dose de células CD34+, por alguma razão clínica [46].

Alguns autores sugerem o uso de fator de crescimento pré-coleta para tentar diminuir o risco de aplasia pós ILD a partir do aumento do número de células CD34+ [47]. Contudo, Flowers et al relataram que o uso de G-CSF em doadores de células para ILD, antes do procedimento de aférese, não reduziu a taxa de aplasia em pacientes com LMC recaída após transplante [48].

Para o doador o procedimento de ILD é bastante seguro e as possíveis complicações são comuns a todos os procedimentos de aférese.

Complicações podem ser relacionadas ao acesso venoso, como hematoma, infecção ou trombose; relacionadas à toxicidade pelo citrato, ou seja, sintomas de hipocalcemia, que podem variar desde parestesias perioral, ou em mãos até convulsões e arritmias cardíacas; relacionadas à alteração da volemia, como

hipotensão ou hipertensão; sintomas alérgicos, de reações urticariformes leves a reações anafiláticas graves e sintomas de reação vasovagal.

Felizmente, a maioria dos sintomas observados pelos doadores durante a coleta está relacionada à toxicidade pelo citrato e é de leve intensidade e autolimitada. Shaz et al observaram sintomas de hipocalcemia em 27 de 51 procedimentos de coleta, sendo 25 parestesias periorais, quatro hipotensões (duas vezes no mesmo doador), uma náusea, uma parestesia (associada a hipotensão) e uma parestesia em mãos. Além desses, um doador apresentou reação urticariforme [45] .

Outra complicação possível após o procedimento é a redução na contagem das células periféricas do doador e suas complicações. Sato et al observaram que a citorredução ocorre em todos os doadores e é estatisticamente significativa. Contudo, não observaram nenhuma evidência clínica de sangramento ou infecção dentre os doadores e nenhum tratamento foi necessário [44].

OBJETIVOS

Este estudo visa:

1. Avaliar os efeitos adversos da coleta de linfócitos para os doadores;
2. Determinar a eficácia do método de coleta de linfócitos;
3. Avaliar os efeitos derivados da infusão de linfócitos para os pacientes;
4. Determinar o efeito da infusão de linfócitos quanto à remissão da doença, redução de recaída e mortalidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo

Foi realizado estudo retrospectivo, por meio de coleta e análise de dados do prontuário médico, do tipo observacional e analítico.

Doadores

Foram analisados os doadores de linfócitos para uso alogênico, no Hemocentro da UNICAMP, de março de 1995, até janeiro de 2008.

Em todos os casos os doadores foram os mesmos do transplante alogênico, totalizando 46 doadores, dos quais 40 (87%) foram incluídos no estudo. Os seis demais doadores (13%) foram excluídos por falta de dados suficientes para análise.

Para análise dos efeitos das coletas de linfócitos para os doadores foram realizados hemogramas imediatamente antes e após cada procedimento de coleta.

Procedimento de coleta de linfócitos

Foram analisados os procedimentos de coleta de linfócitos por aférese realizados em todos os doadores incluídos no estudo.

As coletas foram realizadas por meio de acesso venoso periférico, em equipamento de aférese por fluxo contínuo. Os equipamentos utilizados foram AS104 (Fresenius – Germany), Baxter CS 3000 (Fenwall – USA), Com.tec (Fresenius – Germany), Vivacell BT 798 CE/A (Dideco – Italy) e Cobe-Spectra (Gambro – USA). A escolha do equipamento variou conforme a disponibilidade no serviço.

A quantidade de linfócitos CD3+ a ser coletada foi definida conforme protocolo do serviço entre 1×10^7 e 10×10^7 /Kg do receptor.

O fator de crescimento pré-procedimento foi utilizado nos primeiros 14 procedimentos de coleta, conforme padronizado na época.

Pacientes

Foram analisados todos os pacientes que receberam infusão de linfócitos do doador após transplante alogênico aparentado, no Hospital das Clínicas da UNICAMP, desde o início de sua realização, em março de 1995, até janeiro de 2008.

O número de pacientes incluídos no estudo equivale ao número de doadores, ou seja, um total de 40, sendo trinta (75%) do sexo masculino. A idade dos pacientes na ocasião da primeira infusão de linfócitos variou de 11 a 63 anos (mediana de 37).

O número de pacientes por diagnóstico encontra-se detalhado na tabela 1:

Tabela 1: Número de pacientes por diagnóstico.

PACIENTES	
DOENÇAS	Nº PACIENTES
Leucemia Mielóide Crônica	17
Leucemia Mielóide Aguda	12
Mieloma Múltiplo	6
Leucemia Linfóide Aguda	3
Linfoma Não Hodgkin	1
Linfoma de Hodgkin	1
TOTAL	40

Classificação

Ao diagnóstico os pacientes foram classificados conforme os critérios vigentes na época.

“Status” da doença

Todos os pacientes envolvidos no estudo foram avaliados quanto ao status da doença no momento da indicação ao transplante, antes da infusão de linfócitos e no último acompanhamento, conforme protocolo do Serviço.

Recaída

A recaída foi definida como a recorrência da malignidade após TCTH alogênico, documentada tanto por citogenética (aumento das anormalidades em pelo menos duas ocasiões) ou por recidiva na MO, nodal ou extra-medular.

Falha de indução

Falha de indução foi definida como a impossibilidade do paciente atingir a remissão completa da doença.

Quimera completa

A quimera completa foi definida como detecção de células T do doador (CD3+), em relação à população total de células T maior que 95%.

Quimera mista

A quimera mista indica um estado onde dois sistemas hematopoéticos coexistem em um indivíduo, sendo diagnosticada quando da detecção de células T do doador (CD3+), em relação a população total de células T, de 95% ou menos.

Falha de Pega

A falha de pega foi definida como recuperação medular incompleta ou mesmo ausente após o TCTH alogênico.

Indicação da infusão de linfócitos

Após o transplante alogênico, a infusão de linfócitos do doador teve sua indicação por quadro de recidiva da doença, falha de pega do enxerto ou indução de quimera completa após o transplante.

Grupo comparativo

Para efeitos comparativos da inclusão do procedimento de ILD no protocolo de tratamento de doenças onco-hematológicas, utilizamos um grupo comparativo formado por todos os pacientes do Hemocentro da UNICAMP, com neoplasias hematológicas, que foram submetidos a transplante de células tronco alogênico e não receberam infusão de linfócitos do doador (ILD), desde o início de sua realização em setembro de 1993 até janeiro de 2008, sendo envolvidos 264 pacientes. Destes, a maioria, somando 167 pacientes (63,5%), era do sexo masculino. A idade por ocasião do transplante alogênico variou de quatro a 63 anos (mediana de 36,5).

O número de pacientes por diagnóstico encontra-se detalhado na tabela 2:

Tabela 2: Número de pacientes por diagnóstico - grupo comparativo.

PACIENTES – GRUPO COMPARATIVO	
DOENÇAS	Nº PACIENTES
Leucemia Mielóide Crônica	127
Leucemia Mielóide Aguda	66
Mieloma Múltiplo	16
Leucemia Linfóide Aguda	40
Linfoma Não Hodgkin	10
Linfoma de Hodgkin	5
TOTAL	264

Análise estatística

Foram realizados dois tipos de análises estatísticas, conforme necessidade: descritiva e comparativa.

Para análise estatística comparativa foi utilizado o programa R version 2.7.0 (2008-04-22), Copyright © 2008 The R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0 [49] e R version 2.15.1 (2012-06-22), Copyright (C) 2012 The R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0 [50].

Os testes realizados foram Wilcoxon (pareado e não pareado), para comparação das variáveis contínuas, e Teste Exato de Fisher, para comparação das variáveis categóricas, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Para análise do tempo para óbito foram utilizadas as Curvas de Kaplan-Meier e o Modelo de Cox de Riscos Proporcionais.

RESULTADOS

A infusão de linfócitos do doador (ILD) para pacientes transplantados de MO é dividida em duas etapas: a primeira compreende a coleta de linfócitos a partir do mesmo doador do transplante alogênico e a segunda, a infusão destes linfócitos no paciente (receptor). Os efeitos adversos para os doadores, a eficácia da coleta e efeitos adversos e sobre a remissão da doença e redução da recaída para os receptores, foram abordados neste estudo retrospectivo.

1. Efeitos adversos da coleta de linfócitos para os doadores

Foram realizados 57 procedimentos de coleta de linfócitos, com uma média de 1,4 procedimentos por doador. Contudo, ao analisarmos os dados observamos que, para a maioria dos doadores (32 doadores – 80% dos casos), foi realizado apenas um procedimento de coleta por leucaférese. Entre os doadores que realizaram mais de uma coleta, cinco (12,5%) foram submetidos a dois procedimentos, um (2,5%) a três, um (2,5%) a cinco e um (2,5%) a sete procedimentos.

Todas as coletas foram realizadas por meio de acesso venoso periférico, em equipamento de aférese de fluxo contínuo. A escolha do equipamento variou conforme a disponibilidade no serviço.

O número de procedimentos por equipamento encontra-se detalhado na tabela 3:

Tabela 3: Número de procedimentos de coleta e porcentagem por equipamento.

EQUIPAMENTO	Nº PROCEDIMENTOS	PORCENTAGEM (%)
AS104 (Fresenius – Germany)	26	45,5%
Baxter CS 3000 (Fenwall – USA)	10	17,5%
Com.tec (Fresenius – Germany)	12	21%
Vivacell BT 798 CE/A (Dideco – Italy)	06	10,5%
Cobe-Spectra (Gambro – USA)	3	5,5%

Na coleta o fluxo variou de 30 a 75 ml/min (mediana de 60 ml/min). Sua duração variou de 110 a 360 minutos (mediana de 240). O volume sanguíneo processado variou de seis a 15 litros (mediana de 12). O volume coletado mínimo foi de 50 ml e o máximo de 669 ml (mediana de 392).

Para a análise dos efeitos adversos das coletas de linfócitos para os doadores foram realizados hemogramas imediatamente antes e após cada procedimento de coleta. Em seis ocasiões os resultados dos hemogramas após os procedimentos não foram localizados.

A hemoglobina pré-procedimento variou de 10,7 a 17 mg/dl (mediana de 14,4). Em análise individual observamos que em seis ocasiões os doadores apresentaram níveis de hemoglobina abaixo de 12mg/dl, sendo que três eram do sexo feminino (uma dessas realizou dois procedimentos) e um doador do sexo masculino apresentava traço talassêmico, justificando o nível mais baixo de hemoglobina. Em apenas uma situação, de um doador do sexo masculino apresentando hemoglobina pré-procedimento de 11,9 mg/dl, não foi possível justificar o baixo índice de hemoglobina pré-procedimento. Após o procedimento a hemoglobina variou de 8,7 a 17,7 mg/dl (mediana de 13,3).

A leucometria periférica antes dos procedimentos variou de 3900×10^9 a $51400 \times 10^9/L$ (mediana de 6820×10^9). É importante ressaltar que no início da realização dos procedimentos era padronizado o estímulo dos doadores com fator de crescimento hematopoiético e, somente após evidências científicas comprobatórias da eficácia das coletas de linfócitos sem estímulo, o fator de crescimento pré-procedimento deixou de ser utilizado. Assim, dos 40 doadores incluídos no estudo, 14 foram estimulados previamente à coleta com fator de crescimento, contribuindo para o aumento significativo da contagem de leucócitos. Após os procedimentos a leucometria variou de 3000×10^9 a $48500 \times 10^9/L$ (mediana de 7100×10^9).

A contagem de plaquetas pré-procedimento variou de 126000 a $332000 \times 10^9/L$ (mediana de 210000×10^9). Ao término do procedimento a contagem de plaquetas variou de 58000×10^9 a $242000 \times 10^9/L$ (mediana de 136000×10^9).

Os resultados obtidos demonstraram uma diferença significativa entre a dosagem de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas pré e pós-procedimento com um valor de $p < 0,001$, $p = 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Os valores das dosagens de hemoglobina e contagem de leucócitos e plaquetas pré e pós procedimentos, com os respectivos valores de “p” estão detalhados na tabela 4:

Tabela 4: Valores de hemoglobina, leucócitos e plaquetas pré e pós coleta de linfócitos.

DOADORES – GRUPO TOTAL			
PARAMETRO ANALISADO	PRÉ COLETA	PÓS COLETA	VALOR “p”
HEMOGLOBINA	14,4mg/dl (10,7 – 17)	13,3 mg/dl (8,7 - 17,7)	$p < 0,001$
LEUCÓCITOS	$6820 \times 10^9/L$ (3900 – 51400)	$7100 \times 10^9/L$ (3000 - 48500)	$p = 0,01$
PLAQUETAS	$210000 \times 10^9/L$ (126000 – 332000)	$136000 \times 10^9/L$ (58000 – 242000)	$p < 0,001$

Nos gráficos 1, 2 e 3 estão representadas diferenças entre as dosagens de hemoglobina e contagens de leucócitos e plaquetas pré e pós coleta de cada doador.

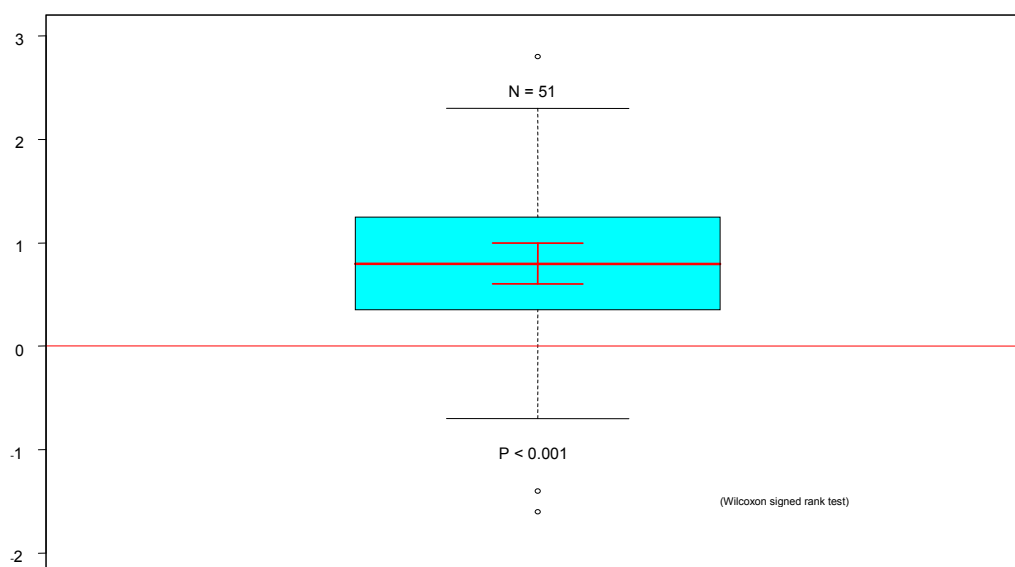


Gráfico 1: Hemoglobina (pré – pós) procedimento.

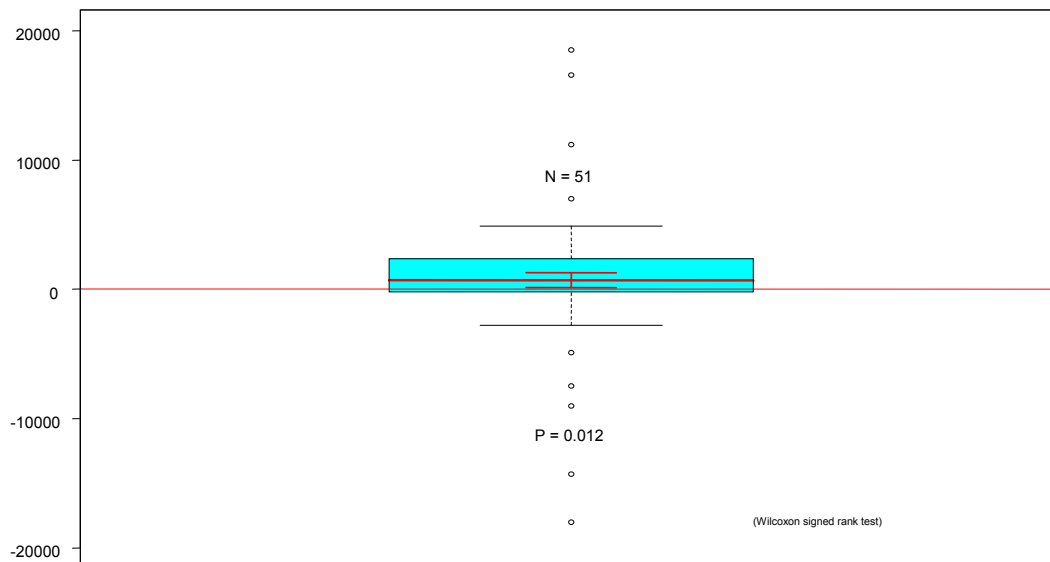


Gráfico 2: Leucócitos (pré – pós) procedimento.

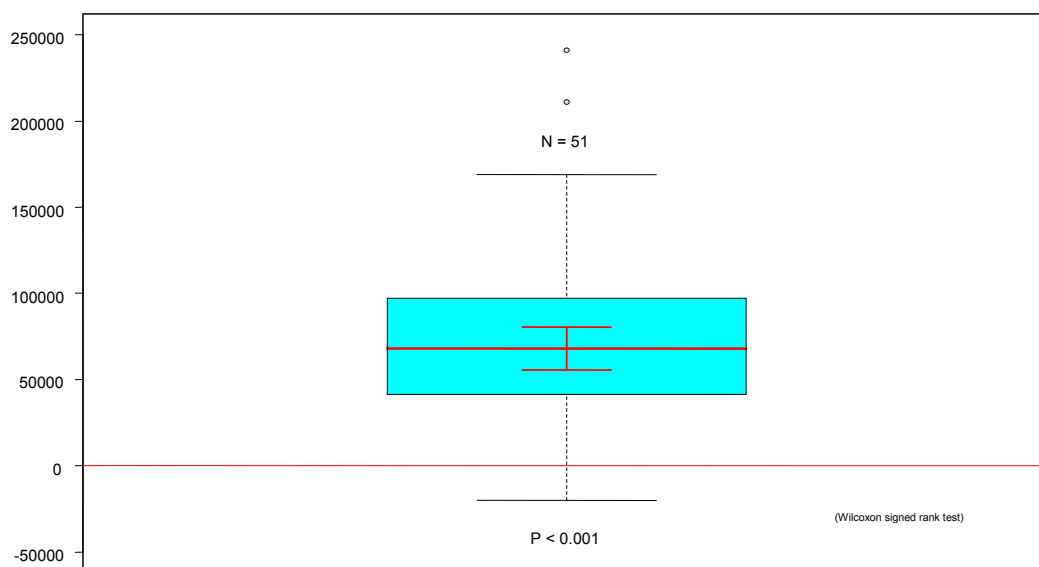


Gráfico 3: Plaquetas (pré – pós) procedimento.

Como descrito anteriormente, alguns doadores realizaram mais de um procedimento, o que pode ter interferido nestes resultados, visto que procedimentos repetidos poderiam levar a contagens celulares mais baixas. Para excluir esta interferência e, considerando que a maioria dos doadores realizou apenas um procedimento, repetimos a análise com o primeiro procedimento de cada doador. Os resultados assim obtidos confirmam a diferença significativa

entre a dosagem de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas pré e pós procedimento, com valores de $p < 0,001$; $p = 0,003$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Nos gráficos 4, 5 e 6 podemos observar a diferença dos resultados pré e pós dos pacientes considerando apenas o primeiro procedimento de coleta de linfócitos.

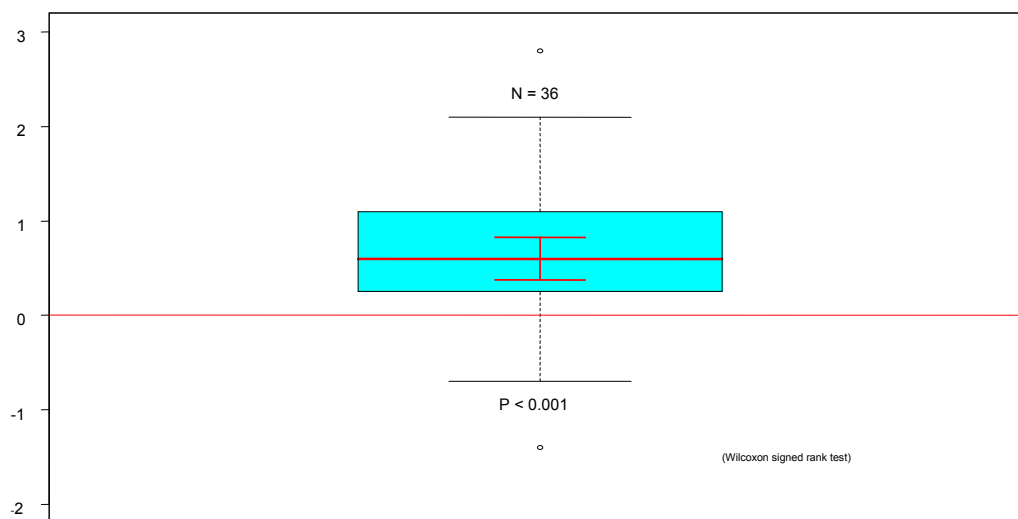


Gráfico 4: Hemoglobina (pré – pós) procedimento. Grupo com 1 procedimento.

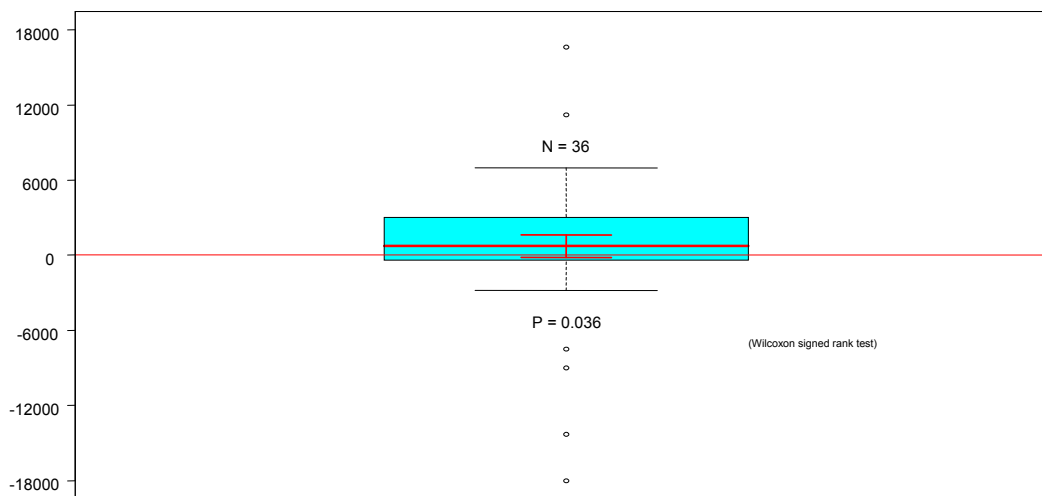


Gráfico 5: Leucócitos (pré – pós) procedimento. Grupo com 1 procedimento.

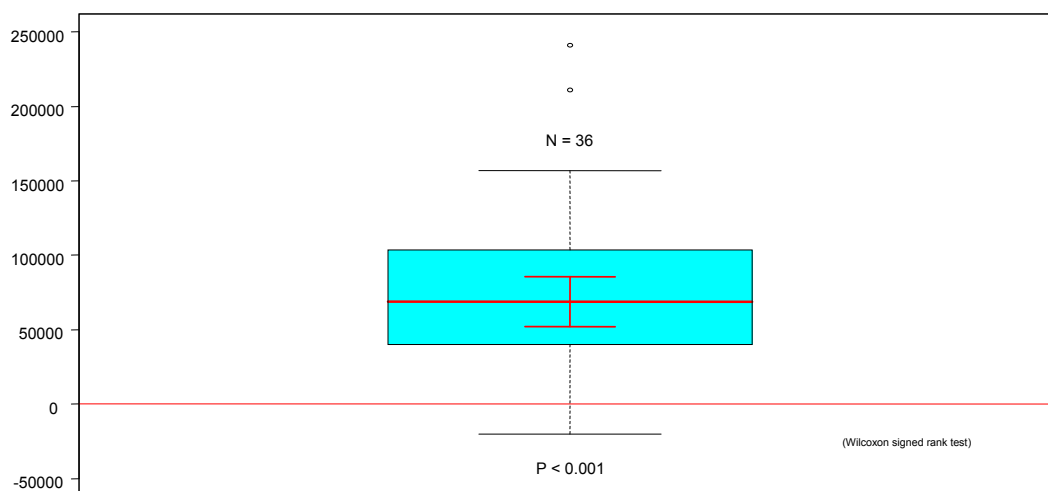


Gráfico 6: Plaquetas (pré – pós) procedimento. Grupo com 1 procedimento.

Ainda comparando os resultados dos exames pré e pós-procedimento podemos determinar a porcentagem de queda dos níveis de hemoglobina, leucócitos e plaquetas decorrentes da coleta de linfócitos. A porcentagem de queda de hemoglobina variou de -10,5% a +18,9% (mediana de 5,3%), a dos leucócitos de -77,3% a +43,4% (mediana de 6,3%); e das plaquetas de -9% a +76,8% (mediana de 37,1%).

A análise estatística desses dados mostra que a porcentagem de queda da hemoglobina, dos leucócitos e das plaquetas é significativa, com valores de $p < 0,001$; $p = 0,027$ e $p < 0,001$, respectivamente. Contudo, novamente, quando consideramos apenas o primeiro procedimento de cada doador, a porcentagem de queda de hemoglobina e plaquetas se mantém significativas ($p < 0,001$, em ambas), enquanto que a porcentagem da queda de leucócitos não ($p = 0,07$).

Os gráficos 7 e 8 apresentam os dados da porcentagem de queda dos níveis de hemoglobina, leucócitos e plaquetas, com todos os procedimentos e com apenas o primeiro procedimento de cada doador, respectivamente.

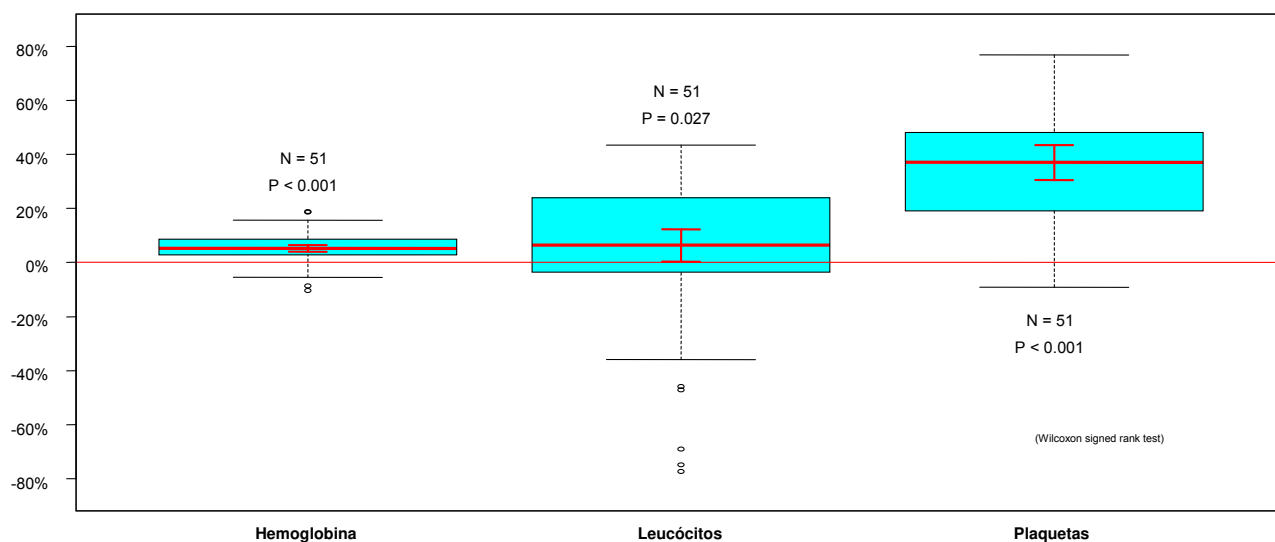
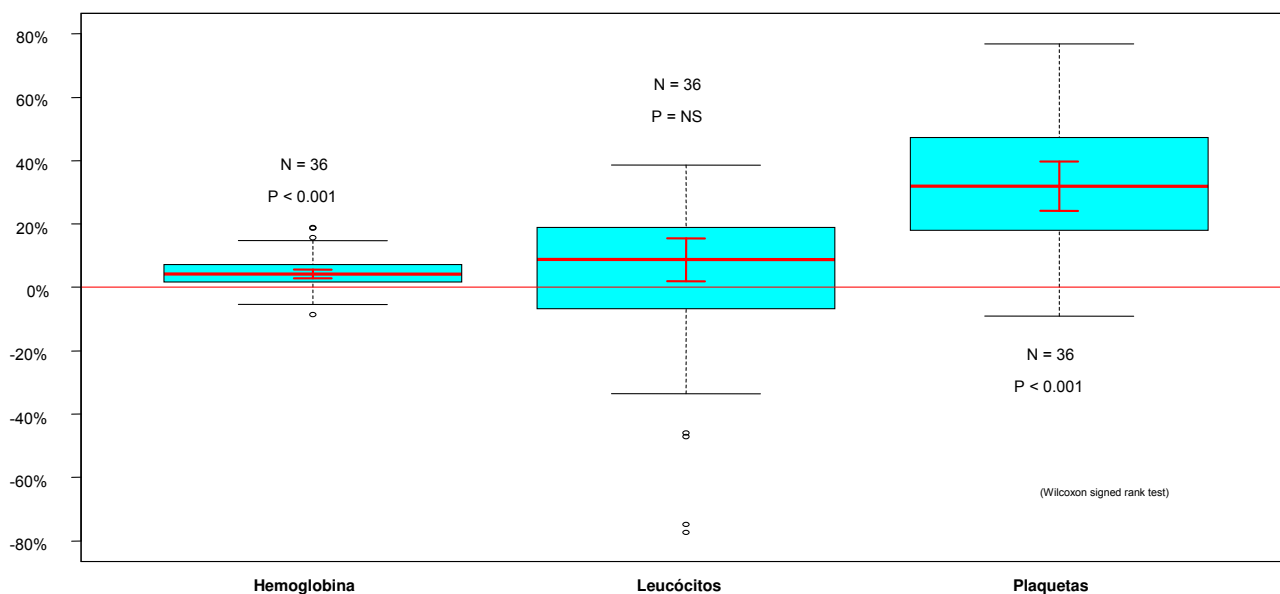


Gráfico 7: Porcentagem de queda hemoglobina, leucóцитos e plaquetas.



**Gráfico 8: Porcentagem de queda hemoglobina, leucóцитos e plaquetas.
Grupo com 1 procedimento.**

Apenas dois doadores (5%) apresentaram reação durante a coleta de linfóцитos. Um doador apresentou parestesia peri-oral, sudorese e queda da pressão arterial com melhora rápida após a administração de solução fisiológica.

O outro apresentou queixa de parestesias com melhora após a administração de gluconato de cálcio. Nenhuma reação grave foi observada.

2. Eficiência do método de coleta

Dos 57 procedimentos, em três não foi possível resgatar a contagem de células CD3+ coletadas por falta de dados no prontuário. Todos os demais 54 procedimentos (94,5%) obtiveram o alvo mínimo de linfócitos coletados de $1 \times 10^7/\text{Kg}$ do receptor e, em 21 procedimentos (39%), o número de células CD3+ coletadas ultrapassou o alvo máximo.

O número de células CD3+ variou de $3,3 \times 10^7$ a $84,8 \times 10^7/\text{Kg}$ (mediana de $8,8 \times 10^7$). Se considerarmos apenas o primeiro procedimento de cada doador o número de células CD3+ variou de $3,7 \times 10^7$ a $84,8 \times 10^7/\text{K}$ (mediana de $9,28 \times 10^7$).

3. Pacientes

⇒ Descrição dos pacientes

No momento da indicação ao transplante dentre os 17 pacientes com LMC, 15 pacientes (88%) encontravam-se na fase crônica, um na fase acelerada e um em crise blástica.

Dos 12 pacientes com LMA dois pacientes apresentavam falha de indução, seis encontravam-se em recaída e quatro em remissão completa.

Dentre os três pacientes com LLA, um paciente apresentava falha de indução, um recaída e um remissão completa.

O paciente com LNH estava em remissão completa no momento da indicação ao transplante, enquanto que o paciente com LH apresentava falha de indução.

Dos seis pacientes com MM, três estavam em resposta parcial, dois com doença em progressão e um em remissão completa.

O status da doença no momento da indicação ao transplante alogênico encontra-se na tabela 5.

Tabela 5: Status da doença na indicação ao TCTH.

“STATUS” NA INDICAÇÃO AO TCTH	Nº PACIENTES
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	17
Fase Crônica	15
Fase Acelerada	1
Crise Blástica	1
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	12
Falha Indução	2
Remissão Completa	4
Recaída	6
MIELOMA MÚLTIPLO	6
Resposta parcial	3
Doença em progressão	2
Remissão completa	1
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	3
Falha indução	1
Recaída	1
Remissão completa	1
LINFOMA NÃO HODGKIN	1
Remissão completa	1
LINFOMA DE HODGKIN	1
Falha indução	1
TOTAL	40

Quanto ao tipo e história de transplante realizado, dentre os 40 pacientes incluídos no estudo, 31 (77,5%) foram inicialmente submetidos ao transplante de células tronco alogênico mieloablativo convencional, seis (15%) ao transplante autólogo seguido de transplante de células tronco alogênico não mielo-ablativo e três (7,5%) ao transplante de células tronco alogênico não mielo-ablativo. Os pacientes submetidos previamente ao transplante autólogo apresentavam diagnóstico de MM em quatro casos, LNH em um caso e LH em um caso. Os pacientes submetidos a transplante não mielo-ablativo tinham como diagnóstico inicial LMC em um caso e MM em dois casos.

Após o transplante alogênico, a infusão de linfócitos do doador nos 40 pacientes tiveram sua indicação em 34 (85%) por quadro de recidiva da doença, em dois (5%) por falha de pega do enxerto e em quatro (10%) com quimera mista, com o objetivo de induzir quimera completa após o transplante, totalizando 53 infusões.

⇒ **Efeitos da infusão nos pacientes**

■ **Doença enxerto contra o hospedeiro**

A manifestação da DECHa foi observada em seis dos 40 pacientes envolvidos no estudo (15%) após a ILD. Dentre estes, três (50%) tinham apresentado DECHa após o transplante alogênico, em um caso localizada e nos outros dois extensa, todos evoluindo com DECHa extensa, após a ILD. Os outros três pacientes não haviam apresentado DECHa após o transplante alogênico, porém, tiveram DECHa extensa após 15, 23 e 40 dias da ILD.

A DECHc foi observada em dez pacientes (25%) após a ILD, sendo que quatro (40%) já haviam apresentado DECHc extensa após o transplante alogênico, persistindo com o quadro após a ILD. Em um caso (10%) o paciente apresentou DECHc localizada após o transplante alogênico, evoluindo com DECHc extensa, após a ILD. Os demais cinco pacientes (50%) não apresentaram DECHc após o transplante alogênico, desenvolvendo DECHc apenas após a ILD. Em um caso o quadro foi localizado e nos outros quatro, foi extenso. Nos casos em que os pacientes já haviam tido DECHc após o transplante alogênico não foi possível identificar o momento, após a ILD, em que o quadro se manifestou e, portanto, a sua correlação com este procedimento. Nas demais situações o diagnóstico de DECHc ocorreu nos dias 25, 98, 195, 337 e 384 após a infusão de linfócitos.

■ **Aplasia de medula óssea**

A aplasia de medula óssea foi observada em quatro pacientes (10%) após a ILD, contudo, a correlação entre estes dois eventos não pôde ser estabelecida.

■ Sobrevida

O seguimento dos pacientes após o transplante variou de 51 a 3856 dias (mediana de 791).

Por ocasião do último seguimento, em janeiro de 2008, 17 pacientes (42,5%) apresentavam recaída, 14 (35%) remissão completa, seis (15%) progressão da doença, um paciente (2,5%) rejeição do enxerto, um (2,5%) remissão parcial e um (2,5%) não foi avaliável por falta de dados no prontuário. Dentre os pacientes que atingiram remissão completa ao final do tratamento a maioria (71,5%) dos casos apresentava diagnóstico inicial de LMC.

O “status” da doença por ocasião do último acompanhamento encontra-se demonstrado na tabela 6.

Tabela 6: Status da doença no último seguimento.

“STATUS” NO SEGUIMENTO	Nº PACIENTES	PORCENTAGEM(%)
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	17	
Remissão completa	10	59%
Recaída	6	35%
Rejeição	1	6%
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	12	
Recaída	8	66,5%
Progressão de doença	2	16,5%
Remissão completa	1	8,5%
Não avaliável	1	8,5%
MIELOMA MÚLTIPLO	6	
Progressão de doença	3	50%
Remissão completa	3	50%
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	3	
Recaída	3	100%
LINFOMA NÃO HODGKIN	1	
Progressão de doença	1	100%
LINFOMA DE HODGKIN	1	
Remissão parcial	1	100%
TOTAL	40	100%

Na ocasião da última avaliação, realizada em janeiro de 2008, dos 40 pacientes incluídos no estudo, 23 (57,5%) tinham evoluído para óbito, sendo sete (30,5%) com diagnóstico de LMC, 11 (48%) com LMA, dois (8,5%) com MM, um (4,5%) com LNH e dois (8,5%) com LLA.

Quando analisamos a porcentagem de óbito por grupo diagnóstico, podemos observar que 100% dos pacientes com LNH, 91,5% dos pacientes com LMA, 66,5% dos pacientes com LLA, 41% dos pacientes com LMC e 33,5% dos pacientes com MM evoluíram a óbito após a ILD.

As causas de óbito nesses pacientes foram recaída da doença de base em 18 pacientes (78%), DECHa em dois (8,5%), DECHc em um (4,5%), infecção em um (4,5%) e hemorragia em um (4,5%). As causas de óbito especificadas de acordo com o diagnóstico estão demonstradas na tabela 7.

Tabela 7: Causas de óbito.

CAUSA ÓBITO	Nº PACIENTES
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	7
DECH aguda	1
Recaída	6
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	11
Infecção	1
DECH aguda	1
Hemorragia intracraniana	1
Recaída	8
MIELOMA MÚLTIPLO	2
DECH crônica	1
Recaída	1
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	2
Recaída	2
LINFOMA NÃO HODGKIN	1
Recaída	1
LINFOMA DE HODGKIN	0
TOTAL	23

O tempo para o óbito neste grupo de pacientes variou de 1,67 a 48,46 meses (mediana 10,21).

Se excluirmos os óbitos e reavaliarmos o “status” dos pacientes por ocasião do último acompanhamento, podemos observar que dentre os dez pacientes com LMC que sobreviveram, nove (90%) estavam em remissão completa e um (10%) em recaída. Apenas um paciente com LMA e um com LLA estavam vivos e ambos (100%) estavam em recaída. Dentre os pacientes com MM, quatro estavam vivos, três (75%) em remissão completa e um (25%) com doença em progressão. O paciente com LH apresentava resposta parcial (100%).

O “status” dos pacientes por ocasião do último acompanhamento, excluídos os óbitos, está demonstrado na tabela 8.

Tabela 8: Status da doença no último acompanhamento depois de excluídos os óbitos.

“STATUS” NO SEGUIMENTO	Nº PACIENTES
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	10
Remissão completa	9
Recaída	1
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	1
Recaída	1
MIELOMA MÚLTIPLO	4
Remissão completa	3
Progressão de doença	1
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	1
Recaída	1
LINFOMA NÃO HODGKIN	0
LINFOMA DE HODGKIN	1
Resposta parcial	1
TOTAL	17

4. Grupo comparativo

No momento da indicação ao transplante dentre os pacientes com LMC, 117 (92%) apresentavam doença em fase crônica, sete (5,5%) em fase acelerada e três (2,5%) em crise blástica.

Dos pacientes com LMA 47 (71,5%) estavam em remissão completa, dez (15%) apresentavam recaída da doença e nove (13,5%) em falha de indução.

Dentre os pacientes com LLA, 29 pacientes (72,5%) estavam em remissão completa e 11 (27,5%) em recaída.

Os pacientes com MM apresentavam progressão de doença em nove (56,25%) casos, resposta parcial em quatro (25%) e doença estável em três (18,75%).

Dos pacientes com LNH, cinco (50%) estavam em recaída, quatro (40%) apresentavam falha de indução e um (10%) em resposta parcial enquanto dos pacientes com LH, três (60%) estavam em recaída e dois (40%) apresentavam falha de indução.

O “status” da doença no momento da indicação ao primeiro transplante encontram-se demonstrados na tabela 9.

Tabela 9: Grupo comparativo - “Status” da doença ao TCTH

STATUS NA INDICAÇÃO AO TCTH	Nº PACIENTES
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	127
Fase crônica	117
Fase acelerada	7
Crise blástica	3
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	66
Remissão completa	47
Recaída	10
Falha de indução	9
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	40
Remissão completa	29
Recaída	11

MIELOMA MÚLTIPLO	16
Resposta parcial	4
Doença estável	3
Doença em progressão	9
LINFOMA NÃO HODGKIN	10
Falha indução	4
Recaída	5
Resposta parcial	1
LINFOMA DE HODGKIN	5
Falha indução	2
Recaída	3
TOTAL	264

Após o transplante alogênico a manifestação da DECHa foi observada em 63 pacientes (24%) e da DECHc em 124 (47%).

Por ocasião do último seguimento, 194 pacientes (73,5%) estavam em remissão completa, 43 (16,5%) não foram avaliáveis, por falta de dados nos prontuários, 16 (6%) estavam em recaída, oito (3%) em progressão da doença e três (1%) em remissão parcial. Dentre os pacientes que atingiram remissão completa ao final do tratamento 43% dos casos (113) apresentavam diagnóstico de LMC.

O “status” da doença por ocasião do último acompanhamento encontra-se especificado na tabela 10.

Tabela 10: Grupo comparativo – “Status” da doença no seguimento.

“STATUS” NO SEGUIMENTO	Nº PACIENTES
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	127
Remissão completa	113
Não avaliável	11
Recaída	3
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	66
Remissão completa	46
Não avaliável	13
Recaída	6
Resposta parcial	1

LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	40
Remissão completa	23
Não avaliável	13
Recaída	4
MIELOMA MÚLTIPLO	16
Remissão completa	6
Progressão de doença	4
Não avaliável	4
Resposta parcial	1
Recaída	1
LINFOMA NÃO HODGKIN	10
Remissão completa	3
Progressão de doença	3
Não avaliável	2
Resposta parcial	1
Recaída	1
LINFOMA DE HODGKIN	5
Remissão completa	3
Progressão de doença	1
Recaída	1
TOTAL	264

No momento da última avaliação, em janeiro de 2008, dos 264 pacientes do grupo comparativo, 144 (54,5%) tinham evoluído para óbito, sendo 62 (43%) com LMC, 33 (23%) com LMA, 30 (21%) com LLA, dez (7%) com MM, sete (4,5%) com LNH e dois (1,5%) com LH.

Quando analisamos a porcentagem de óbito por doença podemos observar que 75% dos pacientes com LLA, 70% com LNH, 62,5% com MM, 50% com LMA, 49% com LMC e 40% com LH evoluíram a óbito após o TCTH alogênico.

As causas dos óbitos foram: infecção em 61 pacientes (42,5%), DECHc em 22 (15,5%), DECHa em 16 (11%), recaída em 15 (10,5%), falência de órgãos em 14 (9,5%), hemorragia em cinco (3,5%), SARA em quatro (3%), progressão em três (2%), doença oclusiva hepática em três (2%) e rejeição em um (0,5%). As causas de óbito especificadas de acordo com o diagnóstico inicial do paciente estão demonstradas na tabela 11.

Tabela 11: Grupo comparativo - Causas de óbito.

CAUSA ÓBITO	Nº PACIENTES
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	62
Infecção	20
DECH crônica	15
DECH aguda	12
Falência de múltiplos órgãos	3
Falência pulmonar	2
Falência hepática	1
SARA	2
Hemorragia pulmonar	1
Hemorragia cerebral	1
Hemorragia gastrointestinal	1
Rejeição	1
Recaída	3
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	33
Infecção	18
DECH crônica	3
DECH aguda	1
Falência cardíaca	1
Falência hepática	1
SARA	2
Hemorragia	1
Recaída	5
VOD	1
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	30
Infecção	14
DECH crônica	2
DECH aguda	3
Falência pulmonar	2
Falência renal	2
Hemorragia pulmonar	1
Recaída	4
VOD	2
MIELOMA MÚLTIPLO	10
Infecção	4
DECH crônica	1
Falência de múltiplos órgãos	2
Recaída	2
Progressão de doença	1

LINFOMA NÃO HODGKIN	7
Infecção	4
DECH crônica	1
Recaída	1
Progressão de doença	1
LINFOMA DE HODGKIN	2
Infecção	1
Progressão de doença	1
TOTAL	144

Neste grupo de pacientes o tempo para o óbito variou de 0,03 a 70,30 meses (mediana 2,82).

Se excluirmos os óbitos e analisarmos novamente o “status” dos pacientes do grupo comparativo por ocasião do último acompanhamento, podemos observar que dentre os 65 pacientes com LMC que sobreviveram, todos (100%) estavam em remissão completa e dentre os 33 pacientes com LMA vivos 30 (91%) estavam em remissão completa, dois (6%) em recaída e um (3%) com resposta parcial. Os seis pacientes com MM que sobreviveram apresentavam remissão completa em cinco casos (83,5%) e resposta parcial em um (16,5%). Dentre os dez pacientes com LLA vivos nove (90%) apresentavam remissão completa e um (10%) não foi possível avaliar, por falta de dados no prontuário. Quanto aos três pacientes com LNH, um (33,3%) apresentava progressão de doença, um (33,3%) resposta parcial e um (33,3%) remissão completa. Dos três pacientes com LH, dois (66,6%) apresentavam remissão completa e um (33,3%) recaída.

O “status” dos pacientes por ocasião do último acompanhamento, após excluídos os óbitos, estão demonstrados na tabela 12.

Tabela 12: Grupo comparativo - “Status” da doença no último acompanhamento depois de excluídos os óbitos.

“STATUS” NO SEGUIMENTO	Nº PACIENTES
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	65
Remissão completa	65
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	33
Remissão completa	30
Recaída	2
Resposta parcial	1
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	10
Remissão completa	9
Não avaliável	1
MIELOMA MÚLTIPLO	6
Remissão completa	5
Resposta parcial	1
LINFOMA NÃO HODGKIN	3
Remissão completa	1
Progressão de doença	1
Resposta parcial	1
LINFOMA DE HODGKIN	3
Remissão completa	2
Recaída	1
TOTAL	120

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de iniciar a análise estatística comparativa dos resultados obtidos foi necessário avaliar se os dois grupos eram comparáveis estatisticamente. Para tanto foi considerada a idade dos pacientes, o sexo e o diagnóstico.

A diferença de idade entre os pacientes do grupo em estudo, que receberam ILD, e do grupo comparativo foi considerada não significativa, com valor de $p=0,24$, pelo teste de Wilcoxon.

A diferença entre o número de pacientes do sexo feminino e masculino no grupo em estudo e no grupo comparativo não foi significativa, com valor de $p=0,16$, pelo teste exato de Fisher.

Quando consideramos o diagnóstico dos pacientes, a diferença entre os dois grupos não foi significativa, com valor de $p=0,275$, pelo teste exato de Fisher.

Estas análises permitiram concluir que os grupos não eram estatisticamente diferentes.

A seguir foram comparados os grupos em relação à mortalidade, causas de óbito, tempo para óbito, incidência de DECHa e DECHc e status da doença no momento do último acompanhamento.

Na mortalidade não houve diferença estatística significativa entre os grupos, com valor de $p=0,85$, pelo teste exato de Fisher.

As causas de óbito foram diferentes estatisticamente entre os grupos, com $p<0,001$, pelo teste exato de Fisher. Quando classificamos as causas de óbito em doença, DECH e outros, a diferença se mantém e podemos observar que no grupo em estudo houve uma maior mortalidade por doença, enquanto no grupo comparativo as outras causas predominaram.

O tempo para óbito também foi estatisticamente diferente entre os grupos, com maior tempo para o grupo em estudo ($p=0,009$), pelo Modelo de Cox. Esta diferença está representada na figura 9.

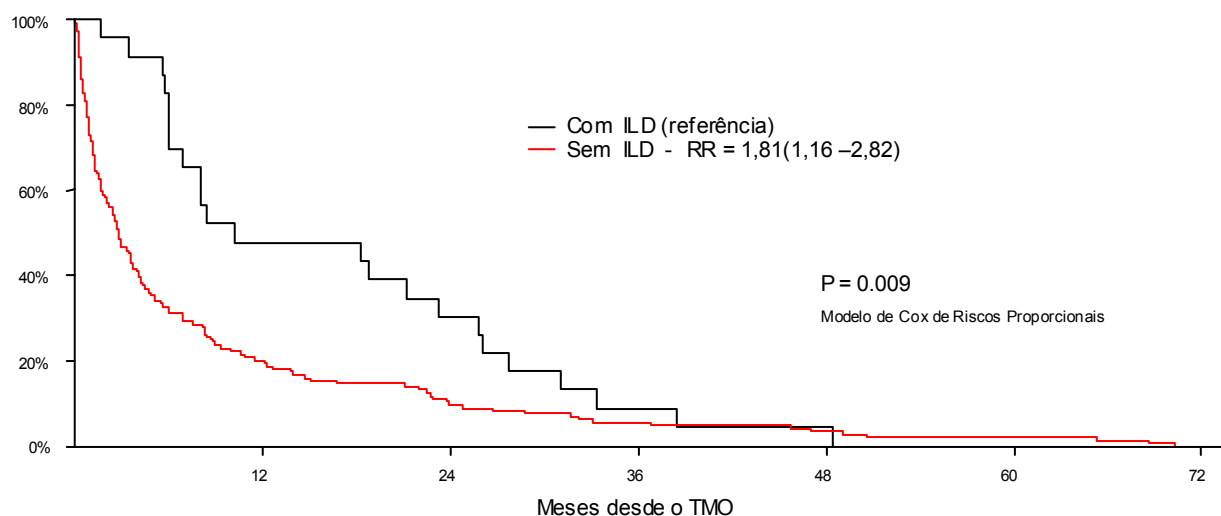


Gráfico 9: Tempo para o óbito : grupo em estudo x grupo comparativo.

A incidência de DECHa não apresentou diferença estatística entre os dois grupos, com valor de $p=0,231$, pelo teste exato de Fisher.

O grupo comparativo apresentou maior incidência de DECHc, com significância estatística ($p<0,001$), em relação ao grupo em estudo, pelo teste exato de Fisher.

Quando avaliamos o status da doença ao último acompanhamento o grupo comparativo apresentou maior taxa de remissão completa, com significância estatística ($p<0,001$), em relação ao grupo em estudo, pelo teste exato de Fisher.

O resumo da análise estatística pode ser visualizado na tabela 13:

Tabela 13: Análise estatística.

PARAMETRO ANALISADO	GRUPO DE ESTUDO	GRUPO CONTROLE	VALOR “p”
DECHa	6 (15%)	63 (24%)	$P=0,231$
DECHc	10 (25%)	124 (47%)	$P<0,001$
REMISSÃO COMPLETA	14 (35%)	194 (73,5%)	$P<0,001$
MORTALIDADE	23 (57,5%)	144 (54,5%)	$P=0,85$
CAUSAS DE ÓBITO	RECAÍDA 18 (78%)	OUTROS 88 (61%)	$P<0,001$
TEMPO PARA ÓBITO	10,21	2,82	$P<0,009$

DISCUSSÃO

O TCTH alogênico tem se mostrado uma terapia eficaz e potencialmente curativa para uma série de neoplasias hematológicas quando se dispõe de um doador compatível [1,2], contudo a recaída permanece como a principal causa de falha deste tratamento [4,5,6].

Para estes pacientes um segundo transplante é a única opção curativa, às custas de elevada morbidade, mortalidade e baixa taxa de sucesso [4,6].

A compreensão dos mecanismos imunes responsáveis pela resposta ao tratamento no transplante alogênico permitiu o surgimento de uma nova modalidade terapêutica para estes casos: a ILD.

Em 1990 Kolb et al. demonstraram a existência de um efeito anti-tumor em pacientes com LMC recaída após o TCTH alogênico [8].

A partir de então, a eficácia da ILD para tratamento de LMC recaída após transplante alogênico foi comprovada por vários grupos [11,12,13,14,15,16]. Além destes estudos isolados, dois grandes estudos retrospectivos, realizados por grupos da América do Norte e Europeu de Transplante de medula, demonstraram os seguintes resultados referentes à taxa de remissão após ILD: 76-79% para pacientes com LMC em fase crônica e 12-28*% em fase avançada, 20% para pacientes com LMA, 9% para pacientes com LLA, 50% para pacientes com MM e 33% para pacientes com síndromes mielodisplásicas (SMD). Até o momento do estudo nenhuma remissão completa tinha sido observada após ILD para pacientes com linfoma, contudo, o número de pacientes descrito era muito pequeno [17,18,19].

Desde então a ILD vem sendo utilizada tanto para tratamento como para profilaxia de recaída e apesar dos resultados iniciais promissores, várias questões permanecem em aberto, como a dose ideal, o melhor momento para infusão, a célula efetora do efeito EVT e DECH e os antígenos tumorais envolvidos.

Neste trabalho mostramos a nossa experiência com a ILD nos primeiros 13 anos de sua realização em nosso Serviço, acompanhando todo o processo, desde a coleta dos linfócitos e sua repercussão para o doador, até a infusão e resposta

para o paciente, com o objetivo de acrescentar informações e colaborar no estudo desta modalidade de tratamento.

Quanto aos doadores, os procedimentos de coleta foram eficientes quanto à quantidade de linfócitos necessárias ao cumprimento das metas do protocolo, entre 10^7 e 10^8 /Kg do receptor. A maioria dos doadores (80%) realizou apenas uma coleta e em todos os casos o limite mínimo foi atingido e em 39% dos casos foi ultrapassado o limite máximo, confirmando esta eficácia com os achados da literatura [45,46].

Em relação ao uso do fator de crescimento pré-coleta nossos achados confirmam os dados da literatura, não sendo necessário o uso do fator de crescimento para coletar a quantidade de células $CD3^+$ estipulada [46].

Para análise do efeito nas contagens celulares dos doadores, secundária a coleta de linfócitos, realizamos hemogramas antes e após cada procedimento de leucaférese e observamos uma queda significativa nos valores de hemoglobina, leucócitos e plaquetas. Esta diferença se mantém significativa quando analisamos apenas o primeiro procedimento de cada doador, indicando que a queda é inerente ao procedimento, independente das características do doador. Avaliamos ainda a porcentagem de queda destes mesmos parâmetros, que também foi significativa. Contudo, quando analisamos apenas o primeiro procedimento de cada doador a porcentagem de queda de leucócitos não é significativa ($p=0,07$), o que pode estar relacionado ao processo de marginação dos leucócitos ou outro processo fisiopatológico, possivelmente maior nos primeiros procedimentos.

Apesar da queda observada nas contagens de hemoglobina, leucócitos e plaquetas, não houve repercussão clínica para os doadores, com nenhum caso de necessidade de transfusão ou tratamento de processo infeccioso. No entanto, para melhor caracterização destes achados e suas consequências para o doador seria necessário um estudo prospectivo de acompanhamento destes doadores após a coleta, até a completa restauração dos seus parâmetros hematológicos.

Quanto aos efeitos adversos, apenas dois doadores (5%) apresentaram reação e, mesmo assim, de pouca gravidade.

Todos estes dados reforçam que o procedimento de coleta de linfócitos é eficaz e bastante seguro para o doador, com poucos efeitos adversos, conforme descrito na literatura [44,45].

Em relação aos pacientes, em nosso estudo a ILD foi indicada em 85% dos casos por quadro de recidiva da doença, em 5% por falha de pega do enxerto e em 10% com quimera mista, com o objetivo de induzir quimera completa após o transplante, caracterizando esta indicação como circunstancial, ou seja, dependente muito mais da condição evolutiva da doença do que do seu diagnóstico ou classificação. Assim este procedimento pode ser inserido no protocolo de diversas doenças e suas fases, tanto como parte da terapêutica quanto para profilaxia em situações de mau prognóstico.

Vários estudos demonstraram estes dados indicando a ILD para distintos diagnósticos, em diferentes fases da doença, com o objetivo de prevenir ou tratar a recaída [1,3,17,18,19,21,51,52].

Analisando os pacientes e seus diagnósticos pudemos observar que a maioria dos pacientes (42,5%) apresentava diagnóstico de LMC. Este dado já era esperado tendo em vista que para estes pacientes a ILD apresenta melhores resultados, conforme já descrito na literatura, com taxas de remissão em torno de 75% para pacientes em fase crônica e sobrevida em cinco anos de até 70% [52,53].

Atualmente, com o advento do uso de inibidores de tirosina quinase, o número de pacientes com LMC com indicação de TCTH tem reduzido, ficando este tratamento restrito a pacientes com intolerância ou resistência a estas medicações [53].

Para as outras neoplasias hematológicas a ILD se mostra menos eficaz, com melhores respostas em pacientes com menor carga tumoral ou citogenética favorável. Nestes casos a quimioterapia ou radioterapia pré-infusão, com o objetivo de reduzir a carga tumoral, poderia aumentar as taxas de resposta. Contudo, não existe consenso entre os estudos sobre a administração de quimioterapia pré-infusão [53,54]. Além disso, seria necessário um estudo separado destes pacientes para determinar o melhor momento, após a

citorredução, para a ILD, visto que a infusão seqüencial poderia resultar em maior toxicidade e incidência de complicações como a DECH e aplasia [1,20,25,55].

No nosso estudo observamos que dentre os pacientes que atingiram remissão completa ao final do tratamento, a maioria (71,5%) dos casos apresentava diagnóstico inicial de LMC, reforçando estes dados.

Para avaliar os efeitos derivados da ILD e determinar sua eficácia quanto à remissão da doença e redução de recaída, comparamos os resultados obtidos com um grupo comparativo, formado por pacientes com neoplasias hematológicas que receberam transplante de células tronco alogênico e não receberam ILD. Estes dois grupos foram semelhantes quanto à idade, sexo ou diagnóstico dos pacientes, permitindo esta análise.

Em relação aos efeitos adversos secundários à ILD, a DECH se destaca, com importante associação entre este efeito, o EVT e a taxa de resposta ao tratamento [1,2]. No nosso estudo observamos uma incidência de DECHa de 15% e de DECHc de 25%, pouco abaixo da incidência de DECHa entre 40-60% e de DECHc entre 33-61%, descritas na literatura [56]. Contudo, ao analisarmos os casos podemos verificar que todos os casos de DECHa foram extensos e nove dos dez casos de DECHc foram extensos, concordantes com a incidência de DECHa grau II-IV em torno de 10-48% e de DECHc extensa entre 11-41%, descritas na literatura [4].

Observamos ainda que, dentre os pacientes que desenvolveram DECHa, 50% já havia apresentado o quadro após o transplante alogênico e dentre os pacientes com DECHc, 50% já tinham manifestado esta complicação após o transplante. Apesar destes dados sugerirem que a DECH pré ILD poderia atuar como fator de risco para o seu desenvolvimento pós ILD, não é possível fazer esta correlação, pois não temos disponíveis os dados sobre a incidência de DECH pré nos pacientes que não desenvolveram DECH pós. Outros estudos considerando estes dados são necessários para confirmar esta hipótese.

Sobre a incidência de DECHa no grupo em estudo e no grupo comparativo, não observamos diferença estatística, com valor de $p=0,231$, pelo teste exato de Fisher.

Contudo, em relação a DECHc, o grupo comparativo apresentou maior incidência, com significância estatística ($p < 0,001$), em relação ao grupo em estudo, pelo teste exato de Fisher.

Analisando estes dados podemos levantar duas questões: 1) Por que não houve diferença na incidência de DECHa no grupo que recebeu ILD? e 2) Por que a incidência de DECHc foi maior no grupo que não recebeu ILD?

Como já é conhecido, a DECH resulta da ação de linfócitos T citotóxicos do doador contra antígenos menores de histocompatibilidade compartilhados pelas células malignas e os tecidos do receptor. Esta ação sofre influência de uma série de fatores como o diagnóstico de base, a dose de células infundidas, o momento da infusão, o grau de parentesco doador-receptor, a presença de células apresentadoras de antígenos e a presença de células T reguladoras [1,2,4,23,53,56]. Considerando que os dois grupos são comparáveis em relação às características dos pacientes, seria esperado que o grupo em estudo apresentasse maior incidência de DECH em relação ao grupo comparativo, resultante da maior quantidade de linfócitos T citotóxicos do doador recebida. É possível que o regime de condicionamento a que são submetidos os pacientes antes do transplante alogênico possa ter contribuído para estes resultados, apresentando maior influência na incidência do que a dose de linfócitos. Nestes casos, o efeito tóxico dos linfócitos seria exacerbado pela presença de citocinas inflamatórias, resultantes do dano tecidual causado pelo regime de condicionamento. Como a ILD foi realizada em um segundo momento, sem condicionamento prévio, esta influência seria menor [1,20,55].

Além disso, nos pacientes submetidos a ILD a presença de quimerismo misto pode implicar num estado de tolerância capaz de limitar a DECH, reduzindo assim sua incidência [56].

Contudo, é importante ressaltar que apesar da incidência de DECH não ter sido maior no grupo que recebeu a ILD, em quase todos os casos os pacientes que desenvolveram DEHC apresentaram o quadro extenso.

Estes resultados sugerem maior influência do momento da infusão na incidência de DECH e da dose de linfócitos na gravidade do quadro. Porém,

outros estudos controlados são necessários para confirmar estes achados. Além disso, conforme descrito anteriormente, outros fatores parecem interferir nestes resultados.

Quando avaliamos o status da doença ao último acompanhamento o grupo comparativo apresentou maior taxa de remissão completa, com significância estatística ($p < 0,001$), em relação ao grupo em estudo, pelo teste exato de Fisher.

A menor taxa de remissão apresentada pelos pacientes do grupo em estudo pode ser resultado da diferença entre os prognósticos dos pacientes envolvidos, tendo em vista que os pacientes com indicação de ILD são aqueles que já não responderam a um tratamento inicial, ou seja, de pior prognóstico, enquanto os pacientes do grupo comparativo apresentaram boa resposta ao TCTH.

Para determinar se a ILD teria realmente algum efeito para os pacientes quanto à remissão da doença seria necessário avaliar pacientes com o mesmo “status” da doença após o TCTH. Para tanto, poderíamos selecionar os pacientes em recaída pós TCTH, separar em dois grupos e em seguida realizar a ILD em apenas um grupo enquanto outro grupo seria submetido a algum tipo de tratamento mais convencional, como a quimioterapia. Contudo, o prognóstico desfavorável destes pacientes e as poucas opções terapêuticas tornam esta opção pouco aceitável. Talvez, de maneira retrospectiva, possamos comparar nosso grupo de estudo com pacientes em recaída antes do advento da ILD.

Além disso, a participação de outros fatores envolvidos na fisiopatologia do efeito EVT pode ter contribuído para estes achados, como a presença de células apresentadoras de antígenos, a presença de células T reguladoras e a susceptibilidade das células malignas ao reconhecimento pelas células T [20,55].

Em relação à mortalidade por ocasião do último seguimento, o grupo em estudo apresentou uma incidência de 57,5%, sendo a principal causa a recaída da doença (78%). No grupo comparativo este valor foi de 54,5%, sendo a causa mais frequente a infecção (42,5%). Quando analisamos estatisticamente estes dados podemos observar que na mortalidade não houve diferença estatística significativa entre os grupos, com valor de $p = 0,85$, pelo teste exato de Fisher. Contudo, em

relação às causas de óbito, houve diferença entre os grupos , com $p < 0,001$, pelo teste exato de Fisher.

Para facilitar esta análise classificamos as causas de óbito em doença, DECH e outros e observamos que esta diferença se mantém, com maior mortalidade por doença no grupo em estudo, enquanto no grupo comparativo as outras causas predominaram.

Estes dados podem sugerir que a ILD não influenciou a mortalidade ou a evolução da doença destes pacientes, que continuam a falecer por recaída da doença. Novamente, o pior prognóstico destes pacientes em relação ao grupo comparativo e a participação de outros fatores podem ter influenciado estes resultados.

Além disso, quando analisamos o tempo para o óbito entre os dois grupos de pacientes, obtivemos um resultado significativamente maior para os pacientes que receberam a ILD, sugerindo que apesar de não influenciar a mortalidade os pacientes poderiam ter algum benefício em relação ao tempo para o óbito. Contudo, a diferença no tamanho das amostras, o pequeno número de pacientes no grupo em estudo e a heterogeneidade da população podem ter influenciado o resultado. Novos estudos, com amostras maiores e homogêneas, considerando além do tempo para o óbito, a sobrevida livre de doença, poderiam ajudar a esclarecer esta questão.

Todos estes achados nos levam a um importante questionamento: Qual o real efeito da ILD na remissão da doença e na sobrevida destes pacientes?

Apenas quando conseguirmos desvendar mais mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos EVT e DECH, poderemos responder a esta questão e, a partir de então, manter ou não a indicação de ILD para nossos pacientes em recaída após TCTH alogênico.

CONCLUSÕES

Nosso estudo permite-nos concluir:

1. Que a coleta de linfócitos é um procedimento bastante seguro para o doador, com poucos efeitos adversos. Dentre estes se destaca a queda significativa observada nos valores de hemoglobina, leucócitos e plaquetas, que é inerente ao procedimento de coleta de linfócitos, contudo, não apresenta repercussão clínica e independe das características dos doadores. A única exceção é a porcentagem de queda do número de leucócitos, quando avaliada em relação ao primeiro procedimento, que pode estar relacionada a uma maior marginação dos leucócitos nestas ocasiões. Todavia, estudos, prospectivos de acompanhamento destes doadores até a normalização de seus parâmetros hematológicos são necessários para confirmar estes achados;
2. Que a coleta de linfócitos é um procedimento eficaz, sem a necessidade do uso de fator de crescimento pré-coleta;
3. Que dentre os efeitos adversos para os pacientes a DECH se sobressai, apresentando incidência em torno de 15% para a DECHa e 25% para a DECHc. Contudo, não foi observada maior incidência de DECHa nos pacientes que receberam ILD e a incidência de DECHc foi menor nestes pacientes, sugerindo que outros fatores, além da dose de linfócitos, devem ser considerados;
4. Que não observamos aumento na remissão da doença ou queda na mortalidade em virtude da ILD, o que pode estar relacionado ao pior prognóstico destes pacientes e a participação de outros fatores envolvidos na fisiopatologia do efeito EVT, como a presença de células apresentadoras de antígenos, a presença de células T reguladoras e a susceptibilidade das células malignas ao reconhecimento pelas células T. Para esclarecer estas questões uma maior compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos efeitos EVT e DECH e mais estudos prospectivos e controlados com ênfase nas novas tentativas de aumentar o efeito EVT e reduzir o efeito DECH são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Luznik L, Fuchs EJ. Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation. *Cancer Control*. 2002; 9:123-37.
2. Dazzi F, Goldman JM. Adoptive immunotherapy following allogeneic bone marrow transplantation. *Annu Rev Med*. 1998;49:329-40.
3. Blair A, Goulden NJ, Libri NA, Oakhill A, Pamphilon DH. Immunotherapeutic strategies in acute lymphoblastic leukaemia relapsing after stem cell transplantation. *Blood*. 2005; 19:289-300.
4. Dazzi F, Fozza C. Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: Risk factors and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20:311-27.
5. Cummins M, Cwynarski K, Marktel S, Dazzi F, Cavenagh J, Clark RE et al. Management of chronic myeloid leukaemia in relapse following donor lymphocyte infusion induced remission: a retrospective study of the clinical trial committee of British Society of Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 36:1065-9.
6. Leis J, Porter DL. Unrelated donor leukocyte infusions to treat relapse after unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2002;43:9-17.
7. Schwartzberg L, Mathe G. White cell transfusions: six years experience. *Br J Haematol*. 1969;17:603-4.
8. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76:2462-5.
9. Korbling M, Giralt S, Khouri I, Mirza N, Donato M, Anderlini P et al. Donor lymphocyte apheresis for adoptive immunotherapy compared with blood stem cell apheresis. *J Clin Apher*. 2001; 16:82-7.

10. Kennedy-Nasser AA, Brenner MK. T-cell therapy after hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2007;14:616-24.
11. Bar BM, Schattenberg A, Mensink EJ, Van Kessel AG, Smetsers TF, Knops GH et al. Donor lymphocyte infusions for chronic myeloid leukemia relapsed after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1993;11:513-9.
12. Helg C, Roux E, Beris P, Cabrol C, Wacker P, Darbellay R et al. Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1993;12:125-9.
13. Hertenstein B, Wiesneth M, Novotny J, Bunjes D, Stefanic M, Heinze B et al. Interferon- α and donor buffy coat transfusions for treatment of relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1993;56:1114-8.
14. Van Rhee F, Lin F, Cullis JO, Spencer A, Cross NCP, Chase A et al. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leucocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood*. 1994;83:3377-83.
15. Drobyski WR, Keever CA, Roth MS, Koethe S, Hanson G, McFadden P et al. Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood*. 1993;82:2310-8.
16. Porter DL, Roth MS, McGarigle C, Ferrara J, Antin JH. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1994;330:100-6.
17. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995;86:2041-50.
18. van Besien KW, de Lima M, Giralto SA, Moore DF Jr, Khouri IF, Rondón G et al. Management of lymphoma recurrence after allogeneic transplantation: the

- relevance of graft-versus lymphoma effect. Bone Marrow Transplant. 1997;19:977-82.
19. Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S, Champlin R et al. Donor lymphocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. J Clin Oncol. 1997;15:433-44.
 20. Porter DL, Antin JH. The graft-versus-leukemia effects of allogeneic cell therapy. Annu Rev Med. 1999; 50:369-86.
 21. Marks DI, Lush R, Cavenagh J, Milligan DW, Schey S, Parker A et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. Blood. 2002; 100:3108-14.
 22. Gilleece MH, Dazzi F. Donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma. 2003; 44:23-8.
 23. Hester J. A clinical role for peripheral blood lymphocyte infusions and perspectives on collection. Ther Apher Dial. 2003;7:305-11.
 24. Porter DL, Antin JH. Adoptive immunotherapy in bone marrow transplantation. In Burakoff S, Deeg H, Ferrara J, eds. Graft-versus-host Disease. New York:Dekker. 1997. pp. 733-54.
 25. Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. Blood. 1992; 80:2964-68.
 26. Sosman JA, Oettel KR, Smith SD, Hank JA, Fisch P, Sondel PM. Specific recognition of human leukemic cells by allogeneic T cells: II. Evidence for HLA-D restricted determinants on leukemic cells that are crossreactive with determinants present on unrelated non-leukemic cells. Blood. 1990;75:2005-16.
 27. Giralt S, Hester J, Huh Y, Hirsch-ginsberg C, Rondon G, Seong D et al. CD8-depleted lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myeloid

- leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1995;86:4337-43.
28. Weiss L, Reich S, Slavin S. The role of non-activated and rIL-2 activated CD4+ and CD8+ T cells in immunotherapy for leukemia. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1999;5:153-8.
29. André-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey S, Vitetta E, Schindler J, Chedeville G et al. Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet*. 2002;360:130-7.
30. Hartwig UF, Nonn M, Khan S, Link I, Huber C, Herr W. Depletion of alloreactive Donor T lymphocytes by CD-95-mediated activation-induced cell death retains antileukemic, antiviral, and immunoregulatory T cell immunity. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:99-109.
31. Resnick IB, Shapira MY, Slavin S. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy for malignant and non-malignant diseases. *Transpl Immunol*. 2005;14:107-19.
32. Fowler DH, Kurasawa K, Husebekk A, Cohen PA, Gress RE. Cells of Th2 cytokine phenotype prevents LPS-induced lethality during murine graft-versus-host reaction. Regulation of cytokines and CD8+ lymphocytes. *J Immunol*. 1994;152:1004-13.
33. Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood*. 1994;84:3540-9.
34. Krenger W, Cooke KR, Crawford JM, Sonis ST, Simmons R, Pan L et al. Transplantation of polarized type 2 donor T cells reduces mortality caused by experimental graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1996;62:1278-85.

35. Krenger W, Snyder K, Smith S, Ferrara JL. Effects of exogenous interleukin 10 in a murine model of graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation*. 1994;58:1251-7.
36. Krenger W, Snyder KM, Byon JC, Falzarano G, Ferrara JL. Polarized type 2 alloreactive CD4+ and CD8+ T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J Immunol*. 1995;155:585-93.
37. Via CS, Finkelman FD. Critical role of interleukin-2 in the development of acute graft-versus-host disease. *Int Immunol*. 1993;5:565-72.
38. Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, Reich L, Collins NH, Boulad F et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leucocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood*. 1995;86:1261-8.
39. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J, Chase A et al. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 95:67-71.
40. Peggs KS, Thomson K, Hart DP, Geary J, Morris EC, Yong K et al. Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism and disease responses. *Blood*. 2004;103:1548-56.
41. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, Craddock C, Kaeda J, Kanfer E et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 96:2712-6.
42. Servida P, Rossini S, Traversari C, Ferrari G, Bonini C, Nobili N et al. Gene transfer into peripheral blood lymphocytes for in vivo immunomodulation of donor anti-tumor immunity in a patient affected by EBV-induced lymphoma. *Blood*. 1993;82:214a.

43. Alyea EP, Soiffer RJ, Canning C, Neuberg D, Schlossman R, Pickett C et al. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4+ donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood*. 1998;91:3678-80.
44. Sato H, Shiobara S, Yasue S, Chuhjo T, Nakao S. Lymphocyte collection for donor leucocyte infusion from normal donors: estimation of the minimum processed blood volume and safety of the procedure. *Vox Sang*. 2001; 81:124-7.
45. Shaz B, Goodarzi K, Malynn E, Uhl L. Improved strategy for mononuclear cell collection for donor lymphocyte infusions. *Transfusion*. 2006; 46:1044-8.
46. Arat M, Arslan O, Gürman G, Dalva K, Ozcan M, Uqur A et al. The impact of granulocyte colony stimulating factor at content of donor lymphocytes collected for cellular immunotherapy. *Transfus Apher Sci*. 2004;30:9-15.
47. Sica S, Di Mario A, Salutari P, Rutella S, Chiusolo P, Rumi C et al. Chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor primed donor leukocyte infusion for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16:483-5.
48. Flowers ME, Leisenring W, Beach K, Riddell S, Radich JP, Higano CS et al. Granulocyte colony-stimulating factor given to donors before apheresis does not prevent aplasia in patients treated with donor leucocyte infusion for recurrent chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000;6:3262-9.
49. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
50. R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

51. Yegin ZA, Ozkurt ZN, Aki SZ, Sucak GT. Donor lymphocyte infusion for leukemia relapse after hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci.* 2010; 42:239-45.
52. Tomblyn M, Lazarus HM. Donor lymphocyte infusions: the long and winding road: how should it be traveled? *Bone Marrow Transplant.* 2008; 42:569-79.
53. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignances after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36:528-38.
54. Soiffer RJ. Donor lymphocyte infusions for acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21(3):455-66.
55. Falkenburg JHF, Warren EH. Graft versus leukemia reactivity after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17:S33-8.
56. Frey NV, Porter DL. Graft-versus-host disease after donor leucocyte infusions: presentation and management. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21(2):205-22.

ANEXOS

ANEXO 1 – Quantidade de células CD3+ por procedimento de coleta.

DOADOR	COLETA 1 (x10 ⁷ /Kg)	COLETA 2 (x10 ⁷ /Kg)	COLETA 3 (x10 ⁷ /Kg)	COLETA 4 (x10 ⁷ /Kg)	COLETA 5 (x10 ⁷ /Kg)	COLETA 6 (x10 ⁷ /Kg)	COLETA 7 (x10 ⁷ /Kg)
1	Não						
2	44,09	Não					
3	28,27						
4	84,82						
5	44,58						
6	14,24						
7	13,31						
8	41,96						
9	11,98						
10	7,82						
11	14,70						
12	Não						
13	10,00						
14	18,71						
15	7,12	9,28	9,54	10,16	11,11	8,68	3,94
16	9,84	4,96	4,21	5,84	4,52		
17	8,61	5,16					
18	7,71						
19	9,72						
20	3,76						
21	6,81						
22	15,70						
23	13,63						
24	11,24	11,83					
25	10,37						
26	6,94						
27	7,88						
28	8,00						
29	8,87						
30	6,72	13,84					
31	8,9						
32	7,29						
33	8,73	4,46	5,88				
34	6,72						
35	12,04						
36	5,87	3,30					
37	6,56						
38	6,31						
39	5,58						
40	11,63						

Não – não quantificado. Dados grifados - coleta acima do alvo superior (10⁸/Kg).

ANEXO 2 – Pacientes do grupo de estudo.

	NOME	REGISTRO	DIAGNÓSTICO
1	LHM	5371286	LMC
2	JMO	5444013	LMC
3	SGC	6288068	LMC
4	ASI	6419089	LMC
5	JLR	6715207	LMC
6	RJSN	7275094	LMC
7	VZ	7687481	LMC
8	LCO	8169329	LMC
9	IDB	8194902	LMC
10	CCL	6091962	LMC
11	JP	5616438	LMC
12	IRG	5733082	LMC
13	TCC	3631543	LMC
14	OV	5882493	LMC
15	RSB	6726137	LMC
16	RSR	6328540	LMC
17	GAR	6588208	LMC
18	PS	5975579	LMA
17	FB	3180988	LMA
20	RJF	7330967	LMA
21	VC	8499124	LMA
22	NGT	8713980	LMA
23	VRA	9052412	LMA
24	LPG	9432733	LMA
25	GAOS	9362572	LMA
26	YCF	3726712	LMA
27	LCL	4959407	LMA
28	RT	6277697	LMMC
29	PCB	4647977	LMA
30	NPC	7473466	MM
31	MTDT	7965875	MM
32	OI	8256631	MM
33	DAAR	9110874	MM
34	OTFN	9254006	MM

35	JBV	7448538	MM
36	ACCF	8034352	LNH
37	MD	7843908	LH
38	TRS	4692845	LLA
39	VEMP	6245967	LLA
40	SAAC	9783392	LLA

ANEXO 3 – Pacientes do grupo comparativo.

	NOME	REGISTRO	DIAGNÓSTICO
1	CFN	3646045	LMC
2	JLSF	3184273	LMC
3	MSAS	3455159	LMC
4	JCR	4124789	LMC
5	JFSS	4170726	LMC
6	GAM	3938367	LMC
7	AAA	4185187	LMC
8	AO	4346327	LMC
9	JRG	4384141	LMC
10	AMEA	4487892	LMC
11	MCP	4521147	LMC
12	MHO	4578699	LMC
13	MAMS	4518283	LMC
14	CMS	4716332	LMC
15	PSO	4732873	LMC
16	EBAF	4232269	LMC
17	LPM	4825454	LMC
18	IS	4578449	LMC
19	MVP	4839641	LMC
20	AZ	4463494	LMC
21	LHR	4916265	LMC
22	MBRN	4981191	LMC
23	MHS	4529836	LMC
24	JCC	5092096	LMC
25	ARS	1934238	LMC
26	VLMM	4938548	LMC
27	MAM	5074385	LMC
28	VL	4453283	LMC
29	MO	5487928	LMC
30	MGP	5530074	LMC
31	LMKA	3016078	LMC
32	APS	5228821	LMC
33	RRS	5553012	LMC
34	SO	5684099	LMC
35	JCR	5409588	LMC
36	DH	5515711	LMC
37	JRM	5827196	LMC
38	JO	5230202	LMC
39	FPE	5764902	LMC

	NOME	REGISTRO	DIAGNÓSTICO
40	RP	5745459	LMC
41	EAT	5409992	LMC
42	FC	5284229	LMC
43	MRS	5644855	LMC
44	VL	6010401	LMC
45	LN	5964962	LMC
46	PRS	5552448	LMC
47	UGS	5311343	LMC
48	JP	5383162	LMC
49	MLS	5919171	LMC
50	RSSA	5918202	LMC
51	MFGM	6226078	LMC
52	LBM	6345456	LMC
53	NDC	5803061	LMC
54	IS	6018522	LMC
55	CRS	6546644	LMC
56	JAF	6074057	LMC
57	EG	6555536	LMC
58	VS	6284428	LMC
59	MBS	6556932	LMC
60	PPS	6476879	LMC
61	AMR	6714310	LMC
62	ESM	6762145	LMC
63	GECB	6923321	LMC
64	DAM	6527878	LMC
65	AB	6926147	LMC
66	LCS	6847230	LMC
67	JBMC	6931885	LMC
68	DRCLT	5787277	LMC
69	RPRR	7003710	LMC
70	OP	6563595	LMC
71	IAM	6621161	LMC
72	AAS	7013521	LMC
73	MAO	5680736	LMC
74	MAA	6935148	LMC
75	RDN	7156898	LMC
76	JMS	6220313	LMC
77	AGF	7054616	LMC
78	KBS	6919102	LMC
79	RJC	7198975	LMC
80	LR	7210456	LMC

	NOME	REGISTRO	DIAGNÓSTICO
81	EP	6994003	LMC
82	LRDB	7142201	LMC
83	NQS	6705369	LMC
84	AFC	7357018	LMC
85	MAL	7537892	LMC
86	SSRB	7623530	LMC
87	PHS	7657953	LMC
88	LCAS	7183746	LMC
89	AJR	7826625	LMC
90	CFCI	7548318	LMC
91	JVA	7868184	LMC
92	SAMC	7641691	LMC
93	JDPS	5988079	LMC
94	MFSK	8000616	LMC
95	UFF	7808332	LMC
96	CAO	7848580	LMC
97	JWSM	8095619	LMC
98	DFPB	7646687	LMC
99	JJS	7404536	LMC
100	EC	7904259	LMC
101	OLL	8106024	LMC
102	MBP	7733567	LMC
103	EMS	8211465	LMC
104	JO	8180729	LMC
105	IFFF	8110607	LMC
106	CSV	8137603	LMC
107	NCP	5294517	LMC
108	SCJ	8270352	LMC
109	MGLG	8105082	LMC
110	SFG	8459794	LMC
111	VLBC	8525688	LMC
112	UTL	8457801	LMC
113	MRA	3654377	LMC
114	JDD	7979985	LMC
115	ALGA	8604890	LMC
116	MJM	8459285	LMC
117	JCM	8541238	LMC
118	AMP	8948373	LMC
119	BLC	8906737	LMC
120	NFC	8767016	LMC
121	GAJ	8701854	LMC

	NOME	REGISTRO	DIAGNÓSTICO
122	MLOS	9106055	LMC
123	EAB	7439573	LMC
124	CFS	8458784	LMC
125	EDS	7944675	LMC
126	CAFC	7899668	LMC
127	VCR	8777540	LMC
128	GMPV	4220997	LLA
129	ECF	4193823	LLA
130	DQ	4084347	LLA
131	RMPJ	2113938	LLA
132	VAPA	5332561	LLA
133	CGC	5402677	LLA
134	JLM	5904833	LLA
135	AM	5965045	LLA
136	RLG	6156712	LLA
137	PHN	6344450	LLA
138	PEAC	6524139	LLA
139	JRS	7371325	LLA
140	WHSS	7456115	LLA
141	LACJ	7908071	LLA
142	MNP	4853849	LLA
143	BLCE	7599064	LLA
144	CAP	7848726	LLA
145	ABS	7413719	LLA
146	CAGA	8537219	LLA
147	DR	8651047	LLA
148	JBSO	8778873	LLA
149	ARO	8760628	LLA
150	MVB	8740288	LLA
151	LGM	8863351	LLA
152	MLOM	6965371	LLA
153	JAR	8961452	LLA
154	SPS	8709898	LLA
155	JAM	8992788	LLA
156	GFR	9015721	LLA
157	FGM	8040319	LLA
158	RAP	9126031	LLA
159	AMP	9417048	LLA
160	MFCD	9377656	LLA
161	BR	9416529	LLA
162	LAM	7413505	LLA

	NOME	REGISTRO	DIAGNÓSTICO
163	SMACO	9621459	LLA
164	RJRS	3247617	LLA
165	DMPS	9671418	LLA
166	LPC	9759456	LLA
167	IRF	9884364	LLA
168	GRH	4323698	LMA
169	OM	3840304	LMA
170	TM	4067773	LMA
171	PRS	4288147	LMA
172	IJN	4862927	LMA
173	LMS	4871837	LMA
174	MIBP	4787119	LMA
175	AERS	5100203	LMA
176	AFC	5014515	LMA
177	ENM	4741260	LMA
178	CBB	4027161	LMA
179	CFO	5620843	LMA
180	LQ	5609770	LMA
181	LG	4768907	LMA
182	JRMP	5863495	LMA
183	AMB	3295583	LMA
184	JABF	2421414	LMA
185	KCT	6397308	LMA
186	IMMO	6500159	LMA
187	LSO	6584981	LMA
188	FAM	6393586	LMA
189	EF	5948108	LMA
190	LSP	6819118	LMA
191	EPS	6852837	LMA
192	VRS	6858156	LMA
193	ES	6851740	LMA
194	CHFB	7084417	LMA
195	IHR	6904555	LMA
196	PSBL	7063180	LMA
197	ST	7631230	LMA
198	EJS	7434632	LMA
199	RVM	7632236	LMA
200	LAG	7605342	LMA
201	ACL	7643489	LMA
202	NAG	7744047	LMA
203	EMV	7665617	LMA

	NOME	REGISTRO	DIAGNÓSTICO
204	MRM	7718331	LMA
205	IXS	3962217	LMA
206	CMA	7116618	LMA
207	DFF	8306084	LMA
208	KAR	8447345	LMA
209	MRDC	8514726	LMA
210	RCM	8482270	LMA
211	EJB	8556249	LMA
212	VSP	8699457	LMA
213	CFM	8934768	LMA
214	NMSC	8992786	LMA
215	GBS	8180383	LMA
216	FCL	9076606	LMA
217	JCA	7978793	LMA
218	AGMC	9222112	LMA
219	GFL	9045104	LMA
220	ACB	9332630	LMA
221	SCM	9236781	LMA
222	PRF	9351529	LMA
223	CRRO	9355987	LMA
224	EJK	8602248	LMA
225	ERS	9368996	LMA
226	PRS	9438775	LMA
227	RARMS	9254860	LMA
228	CDMJ	9522643	LMA
229	ASS	9626459	LMA
230	TRMZ	9807702	LMA
231	MG	9764221	LMA
232	JAP	9893751	LMA
233	SSML	9897282	LMA
234	AEBA	4630891	MM
235	GT	5145988	MM
236	APLN	5123128	MM
237	MGC	2942046	MM
238	PF	4964731	MM
239	LDC	5572438	MM
240	CAA	6661369	MM
241	JFSJ	6625842	MM
242	MFSS	5930503	MM
243	MM	7271468	MM
244	GH	7757492	MM

	NOME	REGISTRO	DIAGNÓSTICO
245	WAP	8476136	MM
246	DCA	7731688	MM
247	TPS	8052122	MM
248	AMCD	8512651	MM
249	HS	3720766	MM
250	AFO	4314483	LNH
251	CF	6596758	LNH
252	CGCS	6925882	LNH
253	JBSS	6674273	LNH
254	NMS	6352805	LNH
255	JL	5331610	LNH
256	MRC	8451146	LNH
257	PRT	8584616	LNH
258	RVA	8697982	LNH
259	NFS	9913149	LNH
260	SDS	5229940	LH
261	RPB	8180947	LH
262	MUBL	7678058	LH
263	GGR	8926840	LH
264	TSV	9674220	LH