

FRANCISCO JOSÉ PENTEADO ARANHA

***A INFLUÊNCIA DO NÚMERO DOS MONÓCITOS NO
ENXERTO DE MEDULA ÓSSEA E A FREQUÊNCIA DA
DOENÇA DO ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO***

200307289

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

FRANCISCO JOSÉ PENTEADO ARANHA

***A INFLUÊNCIA DOS MONÓCITOS NA DOENÇA DO
ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO E EVOLUÇÃO DO
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA***

*Tese de Doutorado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de Clínica
Médica.*

ORIENTADOR: PROFA. DRA. IRENE G. H. LORAND-METZE

CO-ORIENTADOR: PROF.DR. CÁRMINO ANTONIO DE SOUZA

CAMPINAS

2002

UNIDADE BC
Nº CHAMADA Ar14i
V EX
TOMBO BC/ 52706
PROC 16-124/03
C D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 15/03/03
Vº CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM00180986-3

BIB ID 284957

Ar14i

Aranha, Francisco José Penteado

A influência dos monócitos na doença do enxerto versus hospedeiro e evolução do transplante alogênico de medula óssea / Francisco José Penteado Aranha. -- Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadora : Irene G. H. Lorand-Metze.

Co-orientador: Carmino Antônio de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Medula óssea - Transplante. 2. Monócitos.

I. Lorand-Metze, Irene G. H. II. Souza, Carmino Antônio de.

II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

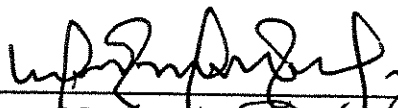
Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): *Profa. Dra. Irene Lorand Metze*

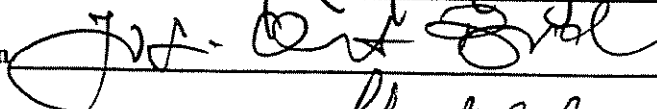


Membros:

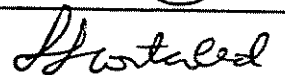
1. Prof. Dr. Márcio Luiz Moore Nucci



2. Prof. Dr. José Orlando Bordin



3. Profa. Dra. Lilian Tereza Lavras Costallat



4. Prof. Dr. Antonio Condino Neto



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

Data: 19.02.2002

DEDICATÓRIA

Para *Zéquita*, meu pai, que viu o mundo dar uma volta de 180°, tudo é possível meu pai.

Veruca, mãe, ausente, sempre presente, me conduziu para cá.

À *Teresa*, ajudou-me a achar o eixo da minha vida.

À **Profa. Irene Lorand-Metze**, meus sinceros agradecimentos, pela liberdade que me deu para conduzir esse trabalho, permitindo-me passar tanto tempo estudando e aprendendo estatística, e por sua orientação, especialmente no momento crucial da finalização do trabalho, não me deixando navegar a esmo.

Ao **Prof. Cármino Antônio de Souza**, co-orientador dessa tese, meu amigo. Pesquisador dessa Universidade, que nos trouxe o prazer de exercermos a nossa profissão, médicos, e não nos sentirmos como peixes fora do aquário. Aprendi com você o valor da pesquisa clínica, tão importante e esquecida por muitos, que a encaram como um viés ruim do cotidiano da Universidade, julgando desprezível a união da prática médica com a pesquisa clínica. Vamos mostrar a esses a qualidade do seu, do nosso trabalho e sua valiosa contribuição à academia. O futuro julgará.

Ao **Prof. Fernando Ferreira Costa**, pelas conversas médicas, pessoais, durante os ambulatórios de terça feira, momentos que, para mim, são privilegiados.

Afonso, capítulo a parte, mais que um colega, mais que um amigo, um irmão. Não tenho, não conheço palavras que fariam jus a um agradecimento, pela ajuda inestimável na realização desse trabalho, nas discussões, eternas e polêmicas. Pelo prazer da troca diária, mesmo nos momentos mais difíceis, nunca perdemos o humor e respeito. Então a você a única coisa que posso dizer, sinceramente, obrigado.

Ao **Roberto Zulli**, pela paciência nas horas das dúvidas, dos ensinamentos de estatística, pelo olhar zeloso nos resultados, deixando-me mais seguro quanto aos resultados obtidos.

Gislaine, inversamente proporcional o meu gostar ao seu metro....., sempre ajudando, sempre presente, sem nunca cobrar nada, valeu. Você é demais, baixinha.

Kátia, mais distante, mas sempre na ajuda, e um dos pontos importantes dessa cooperação é sua memória, que memória.

Elvira, sempre quieta, comendo pela borda, explodindo como pessoa e profissional, é sempre bom tê-la ao nosso lado, todos nós crescemos.

Eliana, pela paciência da elaboração dos dados dos pacientes.

Nós do TMO, agradeço pelos momentos de briga e de interação, não há local para se trabalhar como na nossa unidade de transplante, pelo menos não conheço, sempre com respeito, sem vaidades. Continuemos dessa maneira, devemos mostrar que trabalho, caráter e diferenças podem coexistir de maneira salutar.

Ah! Não poderia esquecer, embora não seja do TMO mas sempre presente, sempre na torcida. A você devo coisas em minha vida que são para sempre, né **Katinha**. Obrigado.

Marga, minha amiga, foi numa das nossas conversas em casa que descobri que tinha realizado um bom trabalho. Escrevi e tudo.

Minha velha amiga, sempre **Carmen**, desde o meu mestrado e agora no exame de qualificação, nos momentos profissionais e pessoais sempre presente. Sempre importante e cáustica, quem nos vê não acredita, viva a nossa peculiar relação.

Ao novo Hemocentro, **André e Márcia**, que vieram somar a essa casa, tão bom saber que podemos dividir o nosso cotidiano aqui e fora, bem vindos.

Aos residentes que estiveram próximos desse trabalho, grandes pessoas, amigos. **Fabiola** (sempre boa de cabeça), **Erich** (o traidor adorável), **Fernanda** (a mais bonita dos R3), **Daniela** (Que Luz!!), **Paulo** (INSS, a fila).

Arlete, que deixou essa tese com cara de tese, nos agüenta há anos, sempre fingindo estar brava, obrigado.

Às velhas amigas, de sempre e para sempre, sempre presentes mesmo na distância do tempo, estou voltando, para continuarmos a celebração das nossas histórias, viu **Verônica, Bibia, Heloisa**.

Cris, talvez, não!!!, é certo, esteja incluída no último parágrafo, parte família, é tudo para todo o sempre.

A nova família que adquiri durante a vida (Jeolás), quando escolhida como tal, as palavras são desnecessárias, a própria escolha e acolhida já dizem tudo. Beijos a vocês todos, malucos adoráveis.

A minha teia de Aranha, saudades, mas o importante é sabermos que sempre estaremos prontos para tudo, como deve ser uma verdadeira teia. Assim nos foi ensinado pelos chefes do nosso clã, assim sempre deveremos proceder.

O LADO FATAL

Quando meu amado morreu, não pude acreditar:
andei pelo quarto sozinha repetindo baixo:
"Não acredito, não acredito."

Beijei sua boca ainda morna,
acarinhei seu cabelo crespo,
tirei sua pesada aliança de prata com meu nome
e botei no dedo.
Ficou larga demais, mas mesmo assim eu uso.

Muita gente veio e se foi.
Olharam, me abraçaram, choraram,
todos com ar de uma incrédula orfandade.

Aquele de quem hoje falam e escrevem
(ou aos poucos vão-se esquecendo)
é muito menos do que este, deitado em meu coração,
meu amante e meu menino ainda.

Deus
(ou foi a Morte?)
golpeou com sua pesada foice
o coração do meu amado
(não se vê a ferida, mas rasgou o meu também).
Ele abriu os olhos, com ar deslumbrado,
disse bem alto meu nome no quarto do hospital,
e partiu.

Quando se foram também os médicos e suas
máquinas inúteis,
ficamos sós: a Morte (ou foi Deus?)
o meu amado e eu.
Enterrei o rosto na curva do seu ombro
como sempre fazia,
disse as palavras de amor que costumávamos trocar.

O silêncio dele era absoluto: seu coração emudecido
e o meu, varados por essa dourada foice.
Por onde vou deixo o rastro de um sangue denso e
triste
que não estancará jamais.

Insensato eu estar aqui, e viva.
O rosto dele me contempla
vincado e triste no retrato sobre minha mesa;
em outros, sorri para mim, apaixonado e feliz.
Insensato, isso de sobreviver:
mas cá estou, na aparência inteira.

Vou à janela esperando que ele apareça
e me acene com aquele seu gesto largo e generoso,
que ao acordar esteja ao meu lado
e que ao telefone seja sempre a sua voz.

Sei e não sei que tudo isso é impossível,
que a morte é um abismo sem pontes
(ao menos por algum tempo).

Sobrevivo, mas pela insensatez.

Pensei que estávamos apenas no começo:
a casa mal-e-mal nos alicerces.
Mas provavelmente estava concluída
e eu não sabia.
Tínhamos erguido em nossos poucos anos
as paredes necessárias;
o telhado se inclinava ao jeito certo,

e havia vidraças nas janelas.
(Éramos felizes ali dentro
mesmo com as tempestades de fora.)
Tudo se construiu num lapso tão curto:
até a porta de entrada, por onde ele saiu
casualmente como quem vai comprar jornal.

A porta está apenas encostada
embora pareça alta, dura, intransponível:
do lado de lá, o meu amor vê as maravilhas
que tanto nos intrigavam nesta vida.

Tanto escrevi sobre a morte
em livros e poemas nesses anos:
sempre achei que a entendia um pouco.

Mas agora que ela me dilacerou a vida,
me rasgou o peito,
me levou o amado,
sinto que mal começo a compreender
sua mensagem:
tirando-o de mim, a morte o devolve
para que seja mais meu.

Dentro de mim um quebra-cabeças, e nele o meu
amado.
Nem Deus o tirará daqui.

O meu amado morreu:
viver sem ele, como dói.
Não tivemos filhos juntos,
nosso passado foi tão breve que era sempre presente.
Um dia ele mandou fazer um par de alianças
de pesada prata, parecendo antigas;
gravou apenas nossos nomes, sem data, e disse:
"Somos um só desde sempre."
Ainda não acreditei em sua morte,
e talvez isso me salve por enquanto.
Levantar-me da cama cada dia é um ato heróico,
acender o cigarro, atender o telefone, tomar café.
Mas faço tudo isso:
falo, ando, recebo visitas.
Compro móveis para a casa onde moro sem ele,
imaginando: será que ele vai gostar?

De algum secreto lugar me vem a força
para erguer a xícara, acender o cigarro,
até sorrir quando alguém me diz:
"Você hoje está com a cara ótima",
quando penso se não doeria menos
jogar-me de um décimo-primeiro andar.

Amado meu, agora morto,
postado do lado de lá da fronteira que nos seduzia,
mudo e quedo como se não existisses:
eu sei que existes,
intensamente, ardentemente existes,
feito e desfeito no fogo de um amor maior que o nosso
mas que nos abrange.

Amado meu, morto agora e para sempre vivo,
hás de ter ainda o intenso olhar que me entendia,
as curvas amorosas da boca que chamou meu nome,
as belas, inquietas mãos que ardiam nas minhas.
Ajuda-me agora, silencioso que estás,
a suportar a sobrevida
e a decifrar esse alto, intransponível muro que me
cerca.

Nunca tivemos filhos juntos, e ele reclamava:
"Nosso amor merecia um filho ao menos."

Nosso filho é a minha dor de hoje,
é a fulguração que nos deixava tontos,
é o novelo da memória que teço e reteço
nas minhas insônias.

Nosso filho é o meu tempo de agora
para falar do meu amado:
da sua força e sua fragilidade,
da sua indignação e seus prantos,
da sua necessidade de ser amado e aceito
como finalmente deve estar sendo, por inteiro,
na realização de todos os seus vastos desejos.

O meu amor enveredou por sua morte
como quem vai a um encontro de amor:
impaciente.
Deixou-me este coração golpeado,
esta derrota.
Mas também ficou a clareza desses anos
e a sensação de que ele finalmente
vive o encontro de amor
que toda a devoção de minha vida não lhe poderia dar.

(Um dia, celebraremos juntos.)

Se me tivessem amputado braços e pernas
e furado o coração com frias facas
e cegado meus olhos com ganchos
e esfolado a minha pele como a de um podre bicho
- nada doeria mais
que te saber morto, amado meu,
depositado
nesse irremediável poço de silêncio de onde não
respondes.

(A não ser em sonho, quando me olhas
e tuas mãos tocam as minhas espalmadas,
abertas, feridas, vazias.)

O meu amado morreu:
preciso viver sua morte até o fim.
Morreu sem que se instalasse entre nós cansaço e
banalidade.
Talvez tenha morrido na medida certa
para nada se desgastar.
Dele me vem a dor, mas também a temura,
a clareza que me permite ver
em todos os rostos o seu rosto
em todos os vultos o seu vulto
e ouvir em todos os silêncios
o seu inesperado riso de criança

Estranha a vida:
fico tangendo meus dias
como um rebanho de ovelhas desordenadas
nessa triste e fria cidade de Porto Alegre
onde ele gostava de estar
olhando o pôr-do-sol e vendo amigos.
"Morrer é tomar um porre de não-desejo"
dizia o meu amado, que era um homem desejoso:
desejava a vida, desejava a morte, desejava a justiça,
desejava a eternidade e a paz.

Estranha a vida:
quando releio uma frase sua,

"viver é modular a morte",
em sangue e dor preparo a minha ida.

Estranho também esse amor,
com hora marcada para a mutilação
da morte, o minuto acertado,
e o fim consultando o relógio
para nos golpear.

Estranho esse amor de agora,
com meu amado atrás de um espelho baço
onde às vezes penso divisar seu vulto
como num aquário.
Enrolado em silêncio,
mais que nunca o meu amor comanda a minha vida.

Não falem alto comigo:
andem sempre na ponta dos pés.
Principalmente, não me toquem.
Finjam que não vêem se tenho um jeito absorto,
se nem sempre entendo as perguntas
com a rapidez de antigamente,
se pareço fatigada
e sem graça como nunca fui.

Façam silêncio ao meu redor.
Não me interessa nada o cotidiano nem o místico.
Não quero discutir o preço do mercado
nem os grandes mistérios da eternidade.

Levo meu amado no peito
como quem carrega nos braços para sempre
uma criança morta.

Amado meu, que tanto ensinaste
de mim a mim mesma, e do mundo
a quem o conhecia pouco:

quando se desfizer escura a noite desta perda,
quero enxergar pelos teus olhos,
amar através do teu amor
as coisas que me restaram.

Amado meu, vivo em mim para sempre,
apesar da ruga a mais
e do olhar mais triste,
devo-te isto:
voltar a amar a vida
como agora amas, inteiramente,
a tua morte.

Lya Luft

("O Lado Fatal", Edições Siciliano, 1988)

	<i>PÁG</i>
RESUMO	<i>xvi</i>
INTRODUÇÃO.....	19
História do Transplante de Medula Óssea.....	20
Doença do Enxerto Versus Hospedeiro Aguda.....	22
- Definição e Causa.....	22
Fisiopatologia da GVHD-A.....	23
Doença do Enxerto-Versus-Hospedeiro Crônica.....	28
Função do Sistema dos Monócitos.....	30
A GVHD e os monócitos.....	33
OBJETIVOS.....	35
PACIENTES E MÉTODOS.....	37
Pacientes.....	38
Doadores.....	38
Avaliações e Definições.....	38
Grau da GVHD-A.....	40
Pele.....	40
Fígado.....	40
Intestino.....	41
Gravidade da GVHD-A.....	41
Grau I.....	41
Grau II.....	41

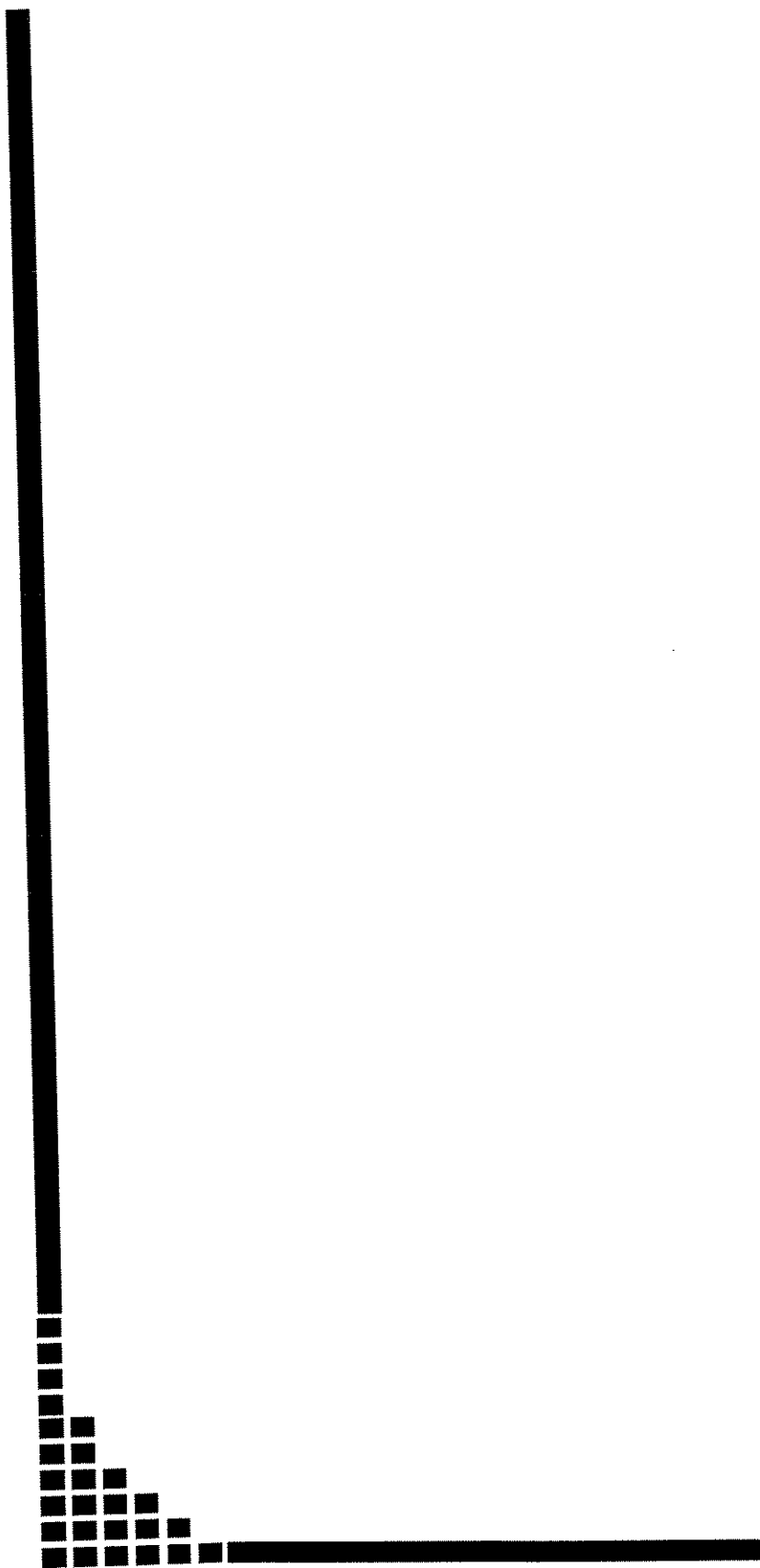
Grau III.....	41
Grau IV.....	41
Classificação da GVHD-C.....	42
Limitada.....	42
Extenso.....	42
Cuidados Gerais.....	42
Métodos estatísticos.....	43
ROC.....	43
Análises Estatísticas e Curvas de Sobrevida.....	44
RESULTADOS.....	45
Doença do Enxerto-Versus-Hospedeiro Aguda e Crônica.....	50
Análise Univariada e Multivariada – GVHD-A e GVHD-C.....	51
Análise da Sobrevida.....	57
DISCUSSÃO.....	63
GVHD-Crônica.....	64
GVHD-Aguda.....	65
A “pega” do Enxerto.....	68
Sobrevida.....	69
Considerações Finais.....	69
CONCLUSÕES.....	70
SUMMARY.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	86

<i>Sigla</i>	<i>Descrição</i>
AA	Anemia aplástica
BU	Bussulfan
CAA	Células apresentadoras de antígenos
CMT	Células mononucleares totais
CNT	Células nucleadas totais
CPP	Transplante alogênico com células progenitoras periféricas
CSF	Fator estimulador de colônias
CSPA	Ciclosporina
CY	Ciclofosfamida
F	Feminino
G-CSF	Fator estimulador de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
GVHD-A	Doença do enxerto-versus-hospedeiro aguda
GVHD-C	Doença do enxerto-versus-hospedeiro crônica
HLA	Antígeno leucocitário humano
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucinas
IFN	Interferon
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LNH	Linfoma não Hodgkin

LPS	Lipopolissacarídeos
LTC	Linfócitos T citotóxicos
M	Masculino
Max	Máximo
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
Min	Mínimo
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
MTX	Metotrexate
NK	“Natural killer”
Nº	Número
RR	Risco relativo
SMD	Síndrome mielodisplásica
TGI	Trato gastro intestinal
TMO	Transplante de medula óssea alogênico
TNF	Fator de necrose tumoral

	PÁG
Tabela 1: Dados clínicos pré-TMO.....	47
Tabela 2: Dados clínicos, tipo de condicionamento e profilaxia para GVHD-A após TMO.....	48
Tabela 3: Características do enxerto.....	48
Tabela 4: Dados da “pega” do enxerto e o tempo de hospitalização.....	49
Tabela 5: Teste de Spearman para correlação entre as células do enxerto.....	49
Tabela 6: Análise univariada da “pega” dos neutrófilos e das plaquetas.....	50
Tabela 7: Frequência de GVHD-A e GVHD-C.....	51
Tabela 8: Pontos de corte para cada célula.....	51
Tabela 9: Análise univariada através da regressão logística em relação à GVHD-A.....	53
Tabela 10: Análise univariada através da regressão logística em relação à GVHD-C.....	54
Tabela 11: Análise da sobrevida global com modelo de Cox.....	57

	<i>PÁG</i>
Figura 1: Esquema das células Th1 e Th2.....	25
Figura 2: Edquema da fisiopatologia da GVHD-A, fase aferente e eferente.....	27
Figura 3: Ativação dos monócitos no local da injúria tecidual.....	31
Figura 4: Ativação da resposta imune primária.....	32
Figura 5: Curva de sensibilidade e especificidade, para exemplo do método ROC para escolha do ponto de corte das variáveis analisadas.....	43
Figura 6: Boxplot através da regressão logística em relação à GVHD-A, para CNT.....	55
Figura 7: Boxplot através da regressão logística em relação à GVHD-A, para CD 14.....	56
Figura 8: Sobrevida global – MO.....	58
Figura 9: Ssobrevida global x GVHD-A.....	59
Figura 10: Ssobrevida global x GVHD-C.....	60
Figura 11: Probabilidade de ocorrer GVHD-A grau II – IV.....	61
Figura 12: Probabilidade de ocorrer GVHD-C extenso.....	62

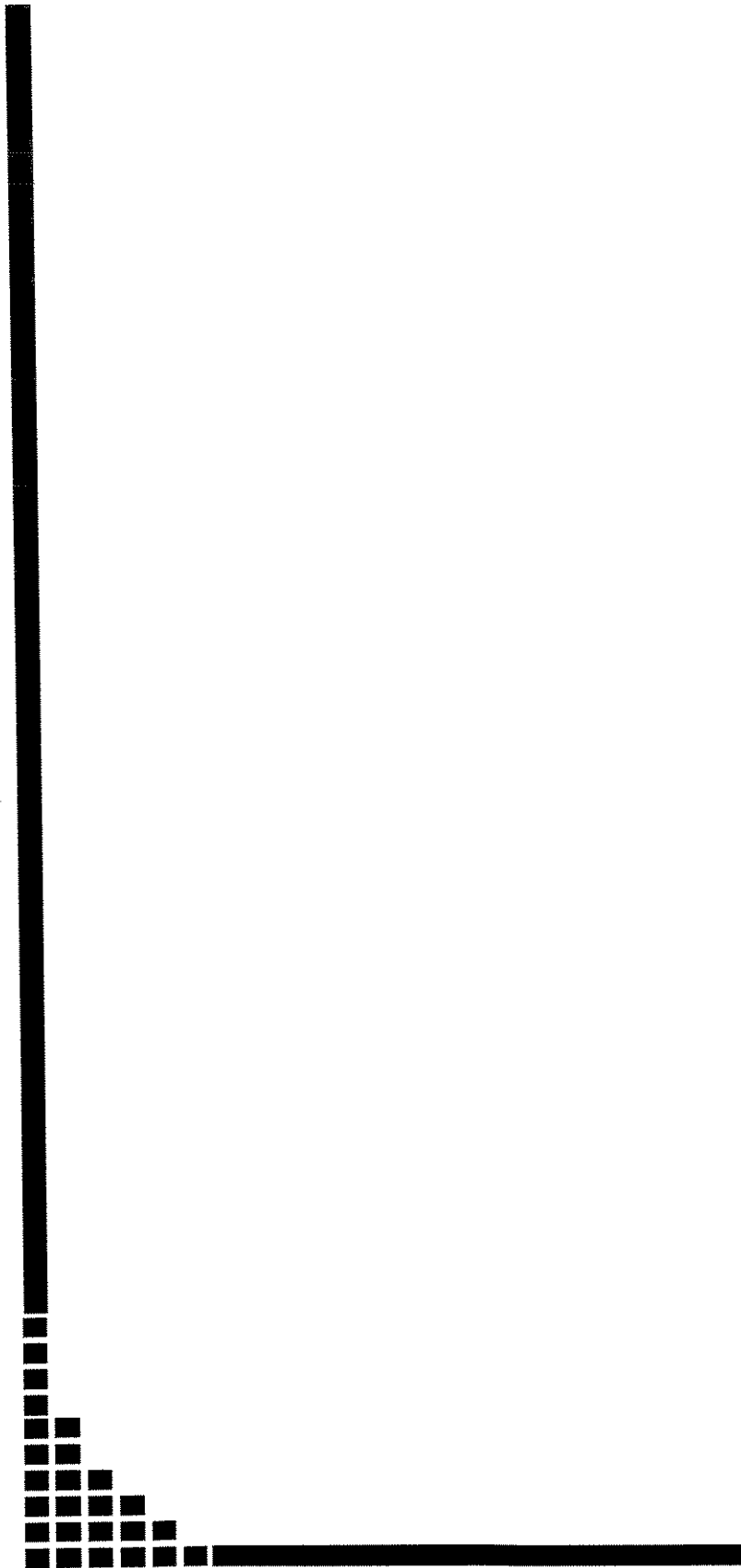


RESUMO

A influência dos monócitos presentes no enxerto de medula óssea sobre a doença do enxerto-versus-hospedeiro não tem sido estabelecida em estudos clínicos. Avaliamos a possível influência dos monócitos no enxerto de medula óssea objetivando, primariamente, analisar a correlação com a GVHD-A e a GVHD-C e, secundariamente, com os dados da “pega” do enxerto e sobrevida. Os critérios de elegibilidade dos pacientes estudados foram: idade <60 anos; com doença primária onco-hematológica ou doença hematológica não maligna. Os pacientes foram transplantados tendo como fonte a medula óssea de doadores aparentados e HLA- completamente compatíveis. Os dados relacionados quanto à composição celular do enxerto foram as células CD34+, as subpopulações de linfócitos T, os linfócitos B e os monócitos. Nós analisamos 83 pacientes condicionados, principalmente, com bussulfan e ciclofosfamida. A profilaxia da GVHD foi realizada com ciclosporina e methotrexate. A mediana de dias para a “pega” de granulócitos $\geq 0,5 \times 10^9/l$ e de plaquetas $>20 \times 10^9/l$ foi de 20 dias (11-34) e 18,5 dias (10-60), respectivamente. Na análise univariada nenhum parâmetro estudado foi correlacionado com “pega” mais rápida do enxerto. A frequência de GVHD-A graus II a IV, foi de 12/83 (14,5%). Na análise univariada as CNT $\geq 2,31 \times 10^8/Kg$ e as células CD14+ $\geq 4,78 \times 10^6/Kg$ foram correlacionadas significativamente com a menor frequência de GVHD-A ($P=0,04$ e $P=0,02$, respectivamente). Além disso, os pacientes com a idade >27 anos e com disparidade de sexo entre doador e receptor apresentaram maior frequência de GVHD-A ($P=0,03$ e $P=0,04$, respectivamente). Na análise multivariada, tanto as CNT como a idade mantiveram a significância em relação à GVHD-A. A probabilidade de apresentar a GVHD-A quando a idade foi <27 anos e as CNT infundidas $\leq 2,31 \times 10^8/Kg$ foi de 3,2%. Um maior risco de GVHD-A (51,5%) foi encontrado quando a idade foi >27 anos e as CNT $\geq 2,31 \times 10^8/Kg$ ($P=0,01$). O número de CD14+ mostrou uma interação entre essas células e as CNT ($R=0,48$ correlação de Spearman).

A GVHD-C foi diagnosticada em 31/77 dos pacientes (40%) avaliados. Encontramos uma correlação entre a presença da GVHD-A com maior risco de GVHD-C ($P<0,01$). Há uma tendência de melhor sobrevida nos pacientes que receberam maior quantidade de células CD34+ ($P=0,06$). As células CD14+ não tiveram qualquer impacto sobre a sobrevida global. Esses dados sugerem que os monócitos podem ter um efeito de

proteção, reduzindo a frequência da doença do enxerto-versus-hospedeiro aguda no TMO alogênico.



INTRODUÇÃO

HISTÓRIA DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

História do transplante de medula óssea

Em 1996 A. R. Perry e D. C. Linch fizeram uma revisão abrangente sobre a história do transplante de medula óssea (PERRY, 1996).

O interesse pelo transplante de medula óssea (TMO) começou após o uso das armas atômicas, em 1945, por causa do efeito da irradiação na população. Em 1949, Jacobson, estudando o efeito da irradiação letal em ratos, com proteção esplênica, descobriu um efeito de proteção do tecido hematopoético presente no baço, estes animais apresentaram recuperação hematológica. Em 1952, Lorenz demonstrou que essa proteção também poderia ser conferida por infusão intravenosa da medula óssea. Nos anos subseqüentes, vários pesquisadores descreveram que as células do doador podiam também repovoar a medula óssea irradiada.

Em 1959, Thomas e colaboradores relataram um caso de sucesso de enxerto com a infusão de medula óssea singênica. No início dos anos 60, foram publicados vários relatos de tratamento de leucemias agudas com TMO sem sucesso. Outros relataram casos de sucesso parcial com essa modalidade terapêutica.

As pesquisas iniciais foram realizadas por E. Donnall Thomas e seu grupo em Nova Iorque, com cachorros. Esses autores irradiaram os animais e infundiram medula óssea autóloga. Os cães que não fizeram o resgate com a medula óssea autóloga evoluíram para óbito. Em um cão mostraram a “pega” do enxerto por longo período - dois anos - após infusão de medula óssea alogênica.

O primeiro problema a ser solucionado era a rejeição do enxerto. O conceito de histocompatibilidade fora introduzido em 1937 por Gorer, e a de rejeição de órgãos por Thomas em 1960. Com os estudos relativos ao TMO, ficou evidente que a irradiação não elimina o sistema imunológico do receptor e os linfócitos residuais podem reconhecer e rejeitar as células do doador.

Foi observado o desenvolvimento de uma síndrome secundária em modelos animais e depois em seres humanos, que ocorria após a “pega” do enxerto, caracterizada por: diarreia, perda de peso, lesões de pele e necrose hepática. Em 1962, Thomas acreditou que se tratasse de uma reação do enxerto contra o hospedeiro. Houve relação entre a gravidade dessa síndrome e a quantidade de tecido linfóide presente no enxerto. Em 1966, Billingham definiu três critérios para a presença da GVHD: o enxerto contém células imunologicamente competentes, os receptores apresentam antígenos reconhecidos como não próprios causando essa síndrome secundária ao TMO e o receptor é incapaz de apresentar uma resposta imunológica para destruir as células do enxerto (FERRARA, 1991). Várias tentativas foram realizadas para diminuir esse efeito do enxerto contra o hospedeiro, o mais efetivo foi o uso de MTX por um período pós TMO, com melhora da “pega” do enxerto e diminuição da frequência da GVHD.

Até 1966, foram realizados 417 TMO alogênicos e somente três pacientes apresentaram “pega” prolongada do enxerto.

O corte epistemológico no TMO deu-se com a descoberta dos antígenos HLA do sistema de histocompatibilidade (HLA). O primeiro TMO HLA compatível foi realizado em 1968 por Thomas. A partir dos anos 70, os TMO foram sempre realizados quando havia histocompatibilidade entre doador e receptor. Inicia-se o tratamento para a GVHD-A com esteróides e globulina anti-timocítica. Em 1980, foram introduzidas a imunossupressão com CSPA e MTX para profilaxia da GVHD-A, até hoje utilizada.

Os regimes de condicionamento foram o enfoque dos estudos nos anos 70. Na tentativa de reduzir a toxicidade, alguns introduziram a CY, outros o BU, além da irradiação corporal total. Nessa época, percebeu-se que os melhores resultados foram obtidos com os pacientes em remissão hematológica completa. Desde então, tornou-se rotina conseguir determinar a melhor indicação do procedimento tanto em relação à doença de base como à escolha dos candidatos.

O transplante com doador não aparentado iniciou-se em meados dos anos 70, com um painel HLA dos doadores voluntários, executado por Anthony Nolan, no Reino Unido. Também começaram a ser realizados os registros do “International Bone Marrow Transplantation Registry” e do “European Blood and Marrow Transplantation”, conseguindo uma melhor análise estatística do TMO e auxiliando nas decisões clínicas.

Atualmente conseguiu-se uma diminuição da toxicidade relacionada ao procedimento e isso se deve a uma melhor seleção dos candidatos, melhora dos testes de tipagem HLA e de compatibilidade (PERRY, 1996).

Nos últimos 50 anos, o TMO vem sendo cada vez mais utilizado como um tratamento curativo para várias doenças hematológicas e não-hematológicas. Várias modalidades foram desenvolvidas durante esses anos, mas permanece ainda, uma percentagem significativa de toxicidade. Além disso, a morbidade e a mortalidade relacionadas ao procedimento, como por exemplo a GVHD aguda e crônica, rejeição e recidiva, são altamente relevantes. Novos estudos devem continuar a ser realizados para tentar minimizar esses efeitos não desejados e, portanto, alcançarem melhores resultados. Assim, mais pacientes poderão se beneficiar desse procedimento.

Doença do enxerto-versus-hospedeiro Aguda

- Definição e causa

Há 60 anos, as células imunocompetentes foram reconhecidas por Gowans como pequenos linfócitos. Atualmente, sabemos que esses linfócitos são células T presentes na medula óssea (FERRARA, 1991).

A GVHD foi primeiramente notada em ratos irradiados que receberam infusão de células alogênicas do baço normal. Quando se recuperavam da aplasia, morriam de uma doença secundária caracterizada por um quadro de diarreia, perda de peso, alterações da pele, alterações hepáticas, reconhecido posteriormente como GVHD (FERRARA, 1991).

Billingham, em 1966, formulou o que seria necessário para o desenvolvimento da GVHD:

- ♦ O enxerto deve conter células imunocompetentes.
- ♦ O receptor deve expressar antígenos teciduais diversos do doador.
- ♦ O receptor é incapaz de apresentar uma resposta imunológica para destruir as células do enxerto.
- ♦ Inapropriado reconhecimento dos antígenos próprios do receptor, um processo auto-imune (FERRARA, 1996).

A GVHD aguda, ocorre nos primeiros 100 dias após o TMO, principalmente entre o 20º e 40º dias, com prevalência entre 30% e 60% dependendo do grau de histocompatibilidade entre doador e receptor, tipo de doador (aparentado ou não), quantidade das células T no enxerto, idade do paciente, doador e receptor de sexos diferentes, gravidez anterior e regime profilático (FERRARA, 1991; WEISDORF, 1991; NASH, 1992; ARAI, 2000). Os órgãos alvos preferenciais são a pele, o intestino e o fígado. As lesões histológicas são localizadas nos tecidos epiteliais dos órgãos alvos (FERRARA, 1991; ARAI, 2000).

Os sintomas clínicos incluem um quadro de dermatite, rash cutâneo maculopapular e eritematoso, que pode evoluir para um quadro de eritrodermia bolhosa e descamação. Na forma hepática observa-se icterícia, aumento das transaminases e da fosfatase alcalina. O acometimento do TGI é semelhante a uma gastroenterite, com diarreia, dor abdominal e quadro clínico de íleo paralítico. Frequentemente há combinação dessas formas de GVHD-A (ARAI, 2000).

Fisiopatologia da GVHD-A

A identidade imunológica de um indivíduo é expressa por algumas proteínas da superfície celular, codificada pelo complexo de histocompatibilidade maior (HCM). As proteínas HCM são denominadas nos humanos como HLA. Os antígenos HLA e os não HLA, esses designados como antígenos menores, são expressos nos tecidos e transferidos do doador para o receptor no TMO, e são essenciais para ativação dos linfócitos T do doador e do receptor (PERREAULT, 1990; FERRARA, 1991). Os antígenos HLA podem causar duas reações imunológicas: uma na direção do hospedeiro versus enxerto, resultando em um quadro de rejeição do enxerto; outra, do enxerto versus hospedeiro, causando um quadro de GVHD. As diferenças dos antígenos entre doador e receptor são um dos fatores mais importantes para indução da GVHD (FERRARA, 1991; MURPHY, 1991; WEISDORF, 1991; ANTIN, 1992).

As células T do doador são importantes na indução da GVHD-A. A retirada dos linfócitos do enxerto previne o seu aparecimento mas, em contrapartida, aumenta a presença de recidiva leucêmica (FERRARA, 1991; BAKER, 1995; HILL, 2000).

Dois modelos de secreção de citocinas polarizadas pelos linfócitos T auxiliares ("T helper - Th) foram descritos, Th1 e Th2. Essa denominação, Th1 e Th2, tem sido empregada para qualquer resposta imunológica influenciada pelo IFN e IL-4, relacionada à resposta imunológica celular ou humoral, respectivamente. A resposta Th1 é caracterizada pela secreção de IL-2, IFN- γ , TNF- β , durante uma reação de hipersensibilidade tardia, e responsável pela imunidade celular adaptativa e da resposta imunológica inata (ou natural). A resposta do tipo Th2 é caracterizada pela secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-6, que promovem a proliferação dos linfócitos B e produção de anticorpos, principalmente IgE e IgG₁, e é responsável pela imunidade humoral. Essas células apresentam uma regulação cruzada, um tipo de célula regula o outro tipo de célula e mecanismo de regulação da resposta imunológica. Por exemplo, a IL-4 inibe a proliferação da célula Th1 e o IFN γ inibe a proliferação da célula Th2 (Del PRETE, 1991, ABBAS, 1966; MOSMANN, 1986). As células Th1 têm importante papel na fisiopatologia da GVHD-A, a "tempestade" de citocinas na GVHD-A é causada por estas células (ANTIN, 1992; HILL, 2000). NIKOLIC et al. (2000), contrariando outros estudos, acreditam no envolvimento tanto das células Th1 como Th2 na fisiopatologia da GVHD-A. A resposta Th2 estaria relacionada com a GVHD de pele e fígado; as células com resposta Th1 com GVHD do TGI.

1º fase – Apresentação do antígeno. O regime de condicionamento causa dano e ativação do tecido do hospedeiro com liberação de citocinas inflamatórias, TNF α e IL-1, com aumento da expressão dos antígenos MHC e das moléculas de adesão nas células apresentadoras de antígenos. Há ainda um reconhecimento pelas células T do doador dos antígenos do MHC e dos antígenos de histocompatibilidade menores (HILL, 2000). As células efetoras reconhecem os antígenos através de receptores específicos localizados na superfície celular e associados ao complexo do receptor das células T-CD3. Os linfócitos T CD4⁺ reconhecem os antígenos do MHC classe II e os linfócitos T CD8⁺ reconhecem os antígenos do MHC classe I (FERRARA, 1991; ANTIN, 1992; MURPHY, 1991; TOWNSEND, 1996; HILL, 2000).

2º fase – Ativação das células T do doador. Caracterizada pela proliferação das células T CD4⁺ do tipo Th1, com secreção de IL-2, TNF γ . Essas citocinas estimulam a proliferação das células que as secretam (efeito autócrino), e há expansão das células T, dos LTC e das células NK. Além disso, estimulam a proliferação de outras células, os fagócitos mononucleares, que secretam IL-1 e TNF α (efeito parácrino) (FERRARA, 1991; ANTIN, 1992; MURPHY, 1997; HILL, 2000; MURPHY, 2001).

3º fase – Função efetora dos fagócitos mononucleares. Os fagócitos mononucleares são também estimulados pelos lipopolissacarídeos. O dano da mucosa intestinal, pela atividade das células efetoras citolíticas, permite que os LPS entrem na circulação sanguínea, estimulando a produção de citocinas pelos linfócitos e macrófagos associados ao TGI, pelos queratinócitos, pelos fibroblastos e pelos macrófagos na pele. Dessa maneira, há uma amplificação da resposta inflamatória local, e os LTC e células NK causam injúria tecidual local (MURPHY, 1991; HILL, 2000).

Há um sistema de retroalimentação desse fenômeno. Com a destruição local do TGI, há um aumento da liberação de LPS, que estimula a produção de citocinas e, dessa maneira, aumenta a lesão tecidual no TGI, causando uma tempestade de citocinas característica da GVHD-A (HILL, 2000).

A fase eferente é menos compreendida. A liberação sistêmica de citocinas é responsável pela morbidade e mortalidade relacionada à GVHD-A. A participação nas lesões dos órgãos alvos é incerta. Há duas explicações para esse fato: 1- a infusão de TNF-

α e IL-1 não leva a uma infiltração linfomononuclear nos órgãos alvos, 2- não há toxicidade relacionada à GVHD em outros órgãos, como por exemplo nos rins, pulmões e sistema nervoso central (HILL, 2000).

Acredita-se que a função citolítica dos linfócitos T estimulados por aloantígenos nos tecidos do receptor cause diretamente danos teciduais e os LPS atue como adjuvante na exposição dos antígenos teciduais. Outra possibilidade é a exposição de neo-antígenos teciduais que são expressos nos órgãos alvos em consequência do processo inflamatório, e que os linfócitos T citotóxicos sejam estimulados por esses antígenos. (FERRARA, 1991; HILL, 2000).

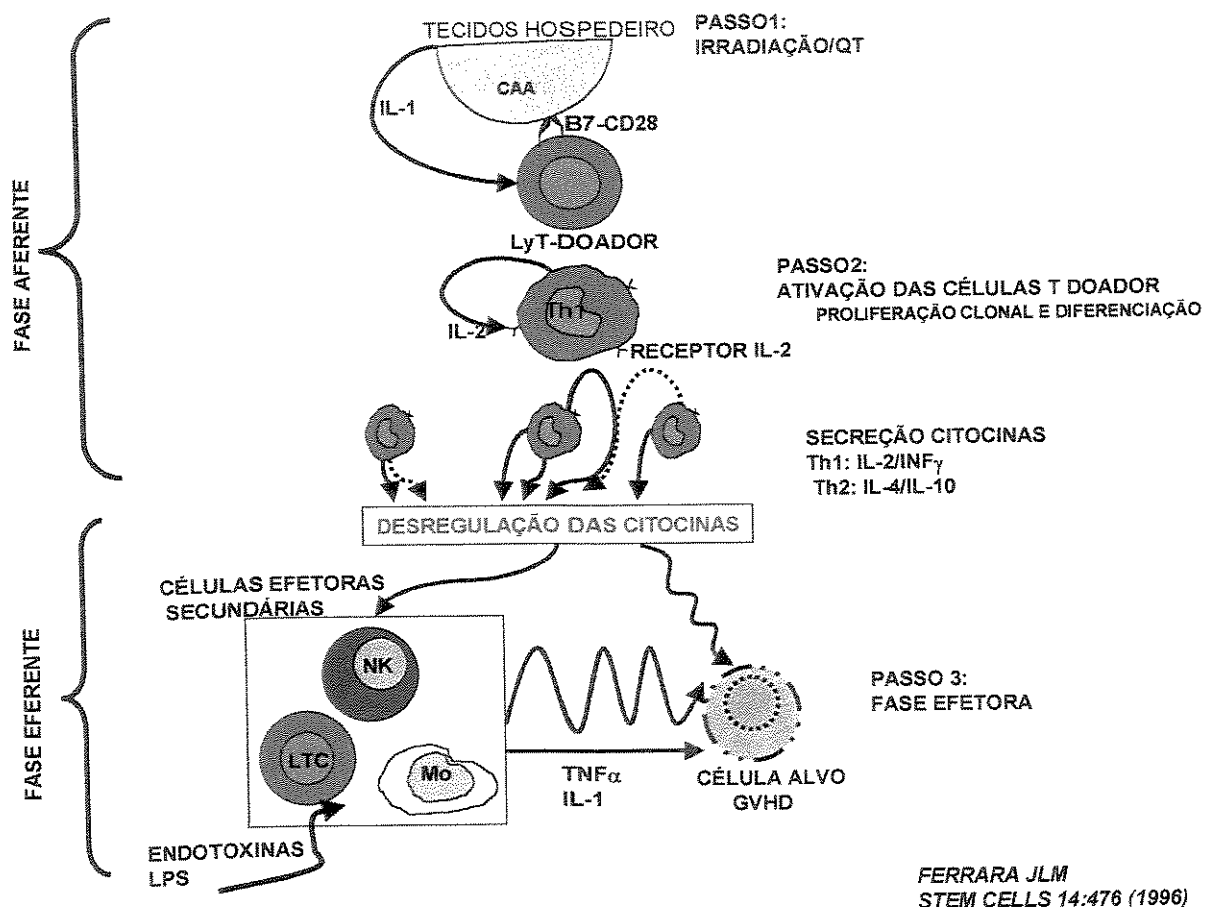


Figura 2: Esquema da fisiopatologia da GVHD-A, fase aferente e eferente

Doença do enxerto-versus-hospedeiro crônica

A GVHD-C ocorre em aproximadamente 60% a 80% dos pacientes submetidos a um TMO alogênico aparentado ou não, com sobrevida maior que 100 dias (RATANATHARATHORN, 1998). A GVHD-C é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, acometendo 25% e 30% dos pacientes portadores de leucemia e anemia aplástica, respectivamente (WINGARD, 1989; SOCIE, 1999). A GVHD-C é definida como a doença que se instala após o dia +100 pós TMO, período em que são realizados os exames para avaliação dessa complicação, pois podem ser preditores do aparecimento da GVHD-C (LOUGHRAN, 1990).

É caracterizada por fibrose da pele, do fígado, dos pulmões e do TGI, imunodeficiência e produção de auto-anticorpos. A síndrome “sicca”, caracterizada por xerostomia, xerofalmlia etc., pode acompanhar o quadro de GVHD-C (FERRARA, 1991; PARKMAN, 1993; RATANATHARATHORN, 1998; VOGELSANG, 2001). Os auto-anticorpos encontrados nos pacientes com GVHD-C foram: anticorpos antinucleares, em 62%; antímúsculo liso, em 49%; antimitocondria, em 11%; antimicrosossomos hepáticos, em 6% e antiepiderme em 11% dos pacientes. Para outros auto-anticorpos, como o antiDNA, os anticentrômeros e o antiducto da glândula salivar, as pesquisas foram negativas (LISTER, 1987; ROUQUETTE-GALLY, 1988; HOLMES, 1989).

O risco da GVHD-C aumenta com a disparidade na tipagem dos HLA entre doador e receptor, principalmente dos antígenos chamados de menores, com o número de linfócitos T presente no enxerto, com a quantidade e a extensão da imunossupressão realizada, com a maior idade do receptor e do doador, doador do sexo feminino e receptor do sexo masculino, com a presença de lesão tecidual causada por quimioterapia, radiação ou infecção principalmente por citomegalovírus. O mais importante fator de risco para a GVHD-C, no entanto, é a presença de GVHD-A nos 100 primeiros dias pós TMO (ATKINSON, 1990; PERREAULT, 1990; SULLIVAN, 1991; RATANATHARATHORN, 1998; SHERER, 1998; VOGELSANG, 2001).

A GVHD-C lembra uma associação de doenças auto-imunes, principalmente do tecido conjuntivo. As células T — CD4+ pós tímicas — são específicas para um antígeno público das moléculas MHC da classe II, que produzem interleucinas. As citocinas Th2 predominam na GVHD-C, a IL-4 está associada com a gamopatia e possivelmente com a esclerodermia, estimulando a produção de colágeno pelos fibroblastos. A IL-5 está relacionada com eosinofilia. A GVHD-C assemelha-se a uma síndrome da desregulação imune, resultando em uma imunodeficiência e autoimunidade, definida como uma doença Th2 (FERRARA, 1991; SHERER, 1998; RATANATHARATHORN, 2001).

Nessas doenças há uma desregulação dos linfócitos B, com produção de auto-anticorpos contra antígenos tanto intracelulares como da superfície celular. No entanto, até hoje não se sabe ao certo o papel desses auto-anticorpos na patofisiologia da GVHD-C (QUARANTA, 1999; ROUQUETTE-GALLY, 1988).

As alterações cutâneas podem estar relacionadas diretamente às células T auto-reativas, pelo dano do timo. A toxicidade sobre o timo pode ser causada pela GVHD aguda, pelo regime de condicionamento e também pela involução e atrofia relacionadas à idade. Portanto, o timo não consegue retirar as células auto-reativas e induzir o mecanismo de imunotolerância. Os pacientes perdem a capacidade de realizar uma seleção positiva necessária para a proteção do sistema imunológico, e há também uma diminuição da seleção negativa, indispensável para imunorregulação da auto-reatividade dos linfócitos T. O dano do timo causa uma diminuição da frequência relativa dos linfócitos T auto-reguladores e um aumento relativo na frequência dos linfócitos T auto-citotóxicos (FERRARA, 1991; PARKMAN, 1993; SHERER, 1998; RATANATHARATHORN, 2001).

Podemos, resumidamente, mostrar que a fisiopatologia da GVHD-C acontece por dois caminhos: a alo-reatividade e a auto-reatividade. A alo-reatividade aos antígenos menores do sistema HLA explica de alguma maneira a GVHD-C como uma fase tardia da GVHD-A. A auto-reatividade é sugerida pelas manifestações clínicas, presença de auto-anticorpos, encontradas em alguns pacientes com GVHD-C e por dados experimentais que sugerem a importância da função do timo na patogênese da GVHD-C (VOGELSANG, 2001).

Função do sistema dos monócitos

O sistema imunológico é uma organização de células e moléculas com papéis definidos na defesa do hospedeiro. Há dois tipos de defesa: a resposta inata (natural) e a resposta adquirida (adaptativa) (DELVES, 2000).

O sistema de defesa natural é composto pelas células do sistema fagocítico: os neutrófilos, os monócitos e os macrófagos, além de células que liberam mediadores inflamatórios, tais como os basófilos, os mastócitos e os eosinófilos. Por último, há as células denominadas de “natural killer” (DELVES, 2000).

O sistema de defesa adquirido está relacionado aos linfócitos B e T. As células apresentadoras de antígenos apresentam os antígenos aos linfócitos, inicia-se assim a resposta específica ao antígeno apresentado. Os linfócitos B produzem imunoglobulinas específicas ao antígeno, o que se denomina de imunidade humoral. Os linfócitos T auxiliam os linfócitos B a secretarem imunoglobulina e podem também erradicar patógenos intracelulares ativando os macrófagos, processo este denominado de imunidade celular (DELVES, 2000)

O sistema fagocitário mononuclear tem a maior população celular do sistema imunológico e auxilia na imunidade celular exercendo funções imunomoduladoras nas doenças infecciosas e malignas. Os monócitos existem como uma população de células não ativadas. Nessa situação, as funções efetoras e secretoras estão inibidas, evitando-se assim reações inflamatórias não específicas (WILLIAMS, 1999).

A função efetora dos monócitos é a capacidade de fagocitar contra microorganismos, células malignas e células apoptóticas. A sua função secretora consiste na liberação de citocinas inflamatórias, como TNF, IL-1 e IL-6, e também citocinas com ações antiinflamatórias, como IL-10 (WILLIAMS, 1999).

No local de lesão tecidual, as células T ativadas secretam citocinas que induzem os monócitos a aderirem às células do endotélio. A ligação dos monócitos ao endotélio acontece pela expressão das moléculas de adesão das células endoteliais e pela ativação das selectinas (LAM-1), que estimulam as moléculas de adesão intercelulares (ICAM-1) e as

moléculas de adesão vascular (VCAM-1) a se expressarem (WILLIAMS, 1999; WILLIAMS, 1999). Os linfócitos T ativados induzem as células endoteliais a secretarem IL-8, causando alterações que facilitam a passagem dos monócitos para o local de injúria tecidual. A ativação dos monócitos e a diferenciação para macrófagos ocorrem seguindo a transmigração e emigração tanto para os tecidos envolvidos na lesão como para os tecidos distantes (WILLIAMS, 1999; WILLIAMS, 1999).

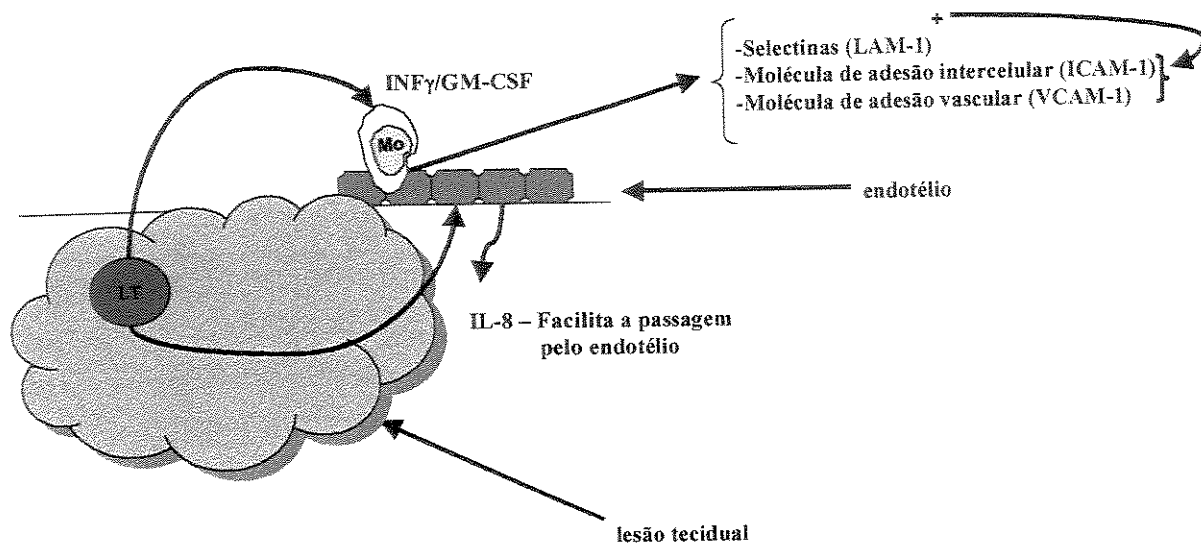


Figura 3: Ativação dos monócitos no local da injúria tecidual

Há duas vias para ativação dos monócitos no local da injúria tecidual. Primeiramente, os linfócitos T ativados secretam citocinas pró-inflamatórias como INF γ e GM-CSF. A seguir, essas citocinas preparam os monócitos para responderem a outras citocinas, como por exemplo TNF γ ou LPS, que também os ativam. Esse efeito de rede é uma ativação das funções efetora e reguladora dos monócitos (WILLIAMS, 1999; WILLIAMS, 1999).

Os monócitos nunca agem isoladamente na resposta da imunidade celular. Sempre há uma cooperação com linfócitos B e T nesse tipo de resposta. Essa cooperação ocorre através da apresentação dos antígenos aos linfócitos via complexo MHC classe II. Consequentemente, há um estímulo da resposta imunológica primária e recrutamento dos linfócitos T $CD4^+$ restritos ao MHC, dos linfócitos T auxiliares, dos linfócitos B, dos monócitos e das células NK. Os monócitos ativados secretam citocinas necessárias para ativação dos linfócitos T e também para o recrutamento de mais monócitos, neutrófilos e linfócitos T, que liberam citocinas IL-2, $IFN\gamma$, TNF e CSF e que estimulam os monócitos (WILLIAMS, 1999; WILLIAMS, 1999; DELVES, 2000).

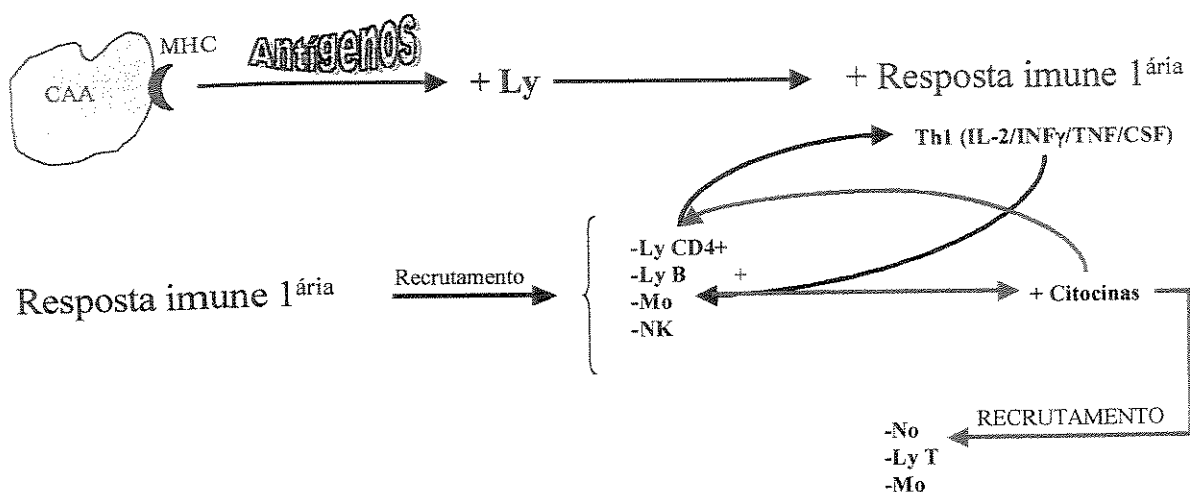


Figura 4: Ativação da resposta imune primária

Em certas condições reguladoras negativas, os antagonistas ao receptor IL-1 e citocinas solúveis ligadas a receptores são liberados causando uma inibição da resposta imunológica celular (WILLIAMS, 1999; WILLIAMS, 1999).

A resposta imunológica celular está relacionada com as citocinas associadas ao Th1 (IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $TNF\beta$). A resposta imunológica humoral (IgE) está relacionada ao Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). A IL-12 e o $IFN\gamma$ induzem as células Th1, a IL-4 e a IL-10 induzem as células Th2 (Del PRETE, 1991; MOSMANN, 1996, ISOBE, 1997). A IL-6 também é capaz de participar da ativação, crescimento e

diferenciação dos linfócitos T (UENO, 1989) e dos linfócitos B (Del PRETE, 1991). A IL-10, que é sintetizada pelos monócitos e linfócitos T, contribui para a proliferação dos linfócitos B e inibe a síntese das citocinas associadas ao tipo-1, dependente das CAA (macrófagos). A IL-10 é uma citocina antiinflamatória, com ações anti IFN γ e anti IL-12. A síntese da IL-10 e IL-1 é regulada pelo TNF dos monócitos (ISOBE, 1997; HSIEH, 1992; HSIEH, 1993). A IL-12 é também sintetizada pelos monócitos e células dendríticas, e estimula a produção do IFN γ pelos linfócitos T, que por sua vez estimulam a síntese da IL-12. O IFN γ inibe a função da IL-4 promovendo uma resposta Th1 por “down-regulation” das citocinas tipo Th2 (TRINCHIERI, 1998). O IFN γ estimula a síntese do TNF e é também importante para a proliferação e diferenciação dos linfócitos. O GM-CSF aumenta a síntese das citocinas, em resposta aos LPS, e também aumenta a ativação dos monócitos e macrófagos. O GM-CSF induz a expressão do TNF nas células mononucleares (WILLIAMS, 1995; BUNDSCHUH, 1997).

A GVHD e os monócitos

Há uma baixa incidência de GVHD-A, não esperada, após TMO com CPP. Esse fato tem sido interpretado de várias maneiras. Em princípio, haveria uma correlação positiva entre a ocorrência da GVHD-A e o número de células T infundidas, que é muito maior no CPP em comparação ao TMO. O que aumenta o risco de GVHD-A (STORB, 1982; KERNAN, 1986). Porém, esse maior número de linfócitos T não parece levar a um aumento da GVHD-A (VIGORITO, 1998, BENSINGER, 2001; VIGORITO, 2001, ZAUCHA JM, 2001). Outros estudos clínicos, entre estes uma meta-análise, sugerem que tanto a GVHD-A como a GVHD-C são mais freqüentes no transplante com CPP (SCHMITZ, 2000; CUTLER, 2001).

As funções efetoras inflamatórias dos fagócitos mononucleares são estimuladas pelas citocinas IL-2 e IFN- γ , secretadas pelas células T ativadas, do tipo Th1. As IL-4 e IL-10 são secretadas pelas células Th2 ativadas e pelos monócitos (MOSMANN, 1996; HSIEH, 1993). O desenvolvimento da GVHD-A é correlacionado com os linfócitos T aloreativos do doador e com as citocinas Th1. A inibição da secreção do IFN- γ pelos linfócitos Th2 e monócitos, causa uma diminuição na mortalidade pela GVHD-A. A IL-10 é uma

interleucina com importante função antiinflamatória, com propriedades de inibição da resposta do tipo-1, promovendo assim a resposta do tipo-2 (MOWAT, 1989; HSIEH, 1992; ALLEN, 1993; KRENGER, 1995 ; KRENGER, 1996 ;ISOBE, 1997).

O tratamento com G-CSF pode alterar a função dos linfócitos T do doador. O seu uso leva a uma polarização das células T do tipo Th1 para linfócitos T do tipo Th2, com propriedades antiinflamatórias (PAN, 1995).

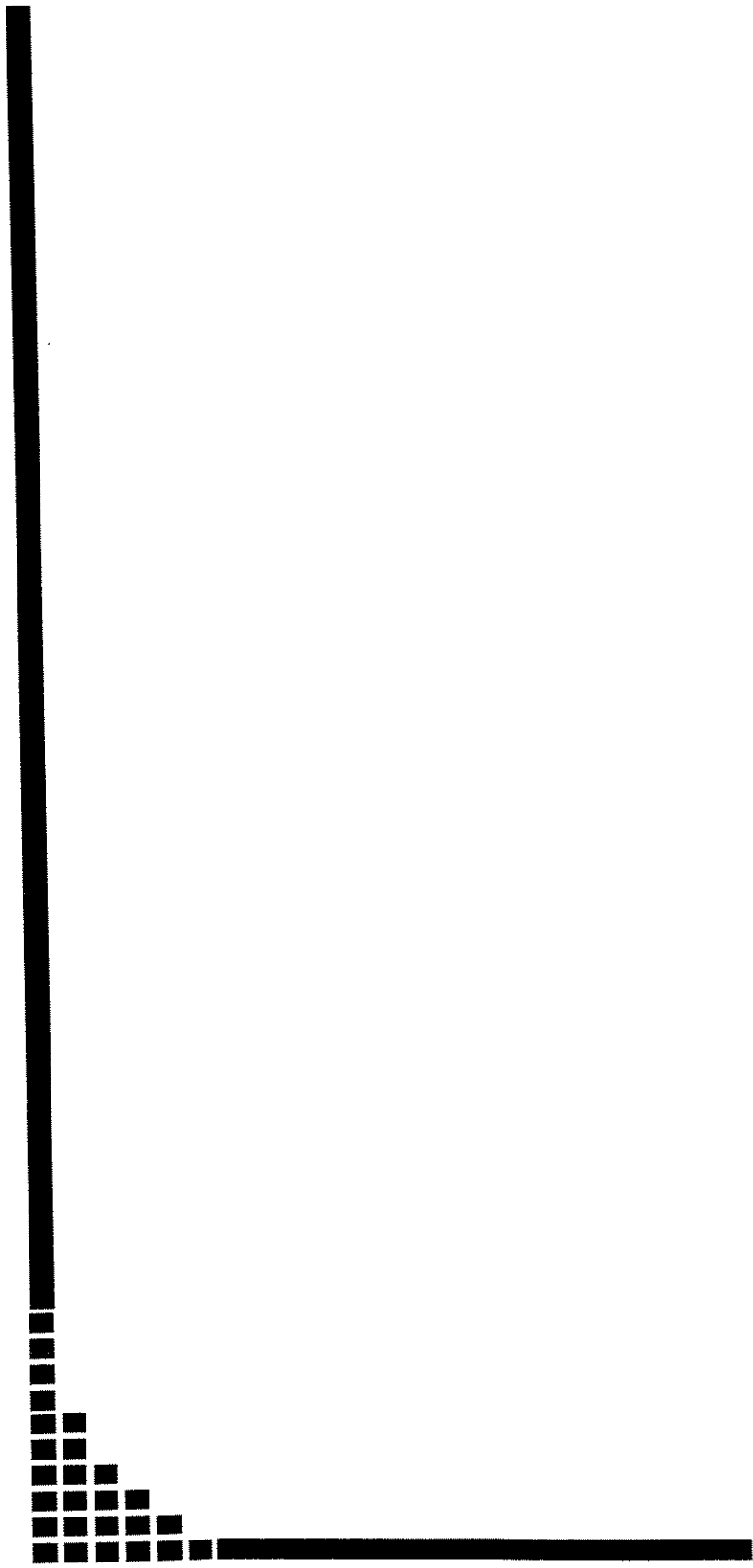
O enxerto estimulado pelo G-CSF pode conter uma população celular capaz de inibir a resposta dos linfócitos T alogênicos. Essas células são os CD14+. Há uma significativa diferença entre os enxertos estimulados e não estimulados pelo G-CSF, com maior número de células no CPP, tanto em número relativo como em número absoluto. Essas células apresentam a mesma função no transplante tanto de MO como no CPP. As diferenças dos resultados clínicos podem ser, ao menos em parte, atribuídas a essa diferença quantitativa entre os enxertos (MIELCAREK, 1996).

As células CD14+ expressam menores níveis das moléculas B7 — que são moléculas co-estimulatórias para os linfócitos T — e assim reduzem a capacidade das células CD4+ para utilizar a via de sinalização CD28 e secretam maiores quantidades de IL-10, o que serve para diminuir a resposta dos linfócitos T aos alo-antígenos (TANAKA, 1998).

Os monócitos estimulam as reações imunológicas e inibem a proliferação dos linfócitos T por mecanismos dependente e independente do contato. A ocorrência da GVHD-A poderia ser dependente do número dos monócitos (quantidade de células CD14+) no enxerto (MUNN,1996; MIELCAREK, 1997).

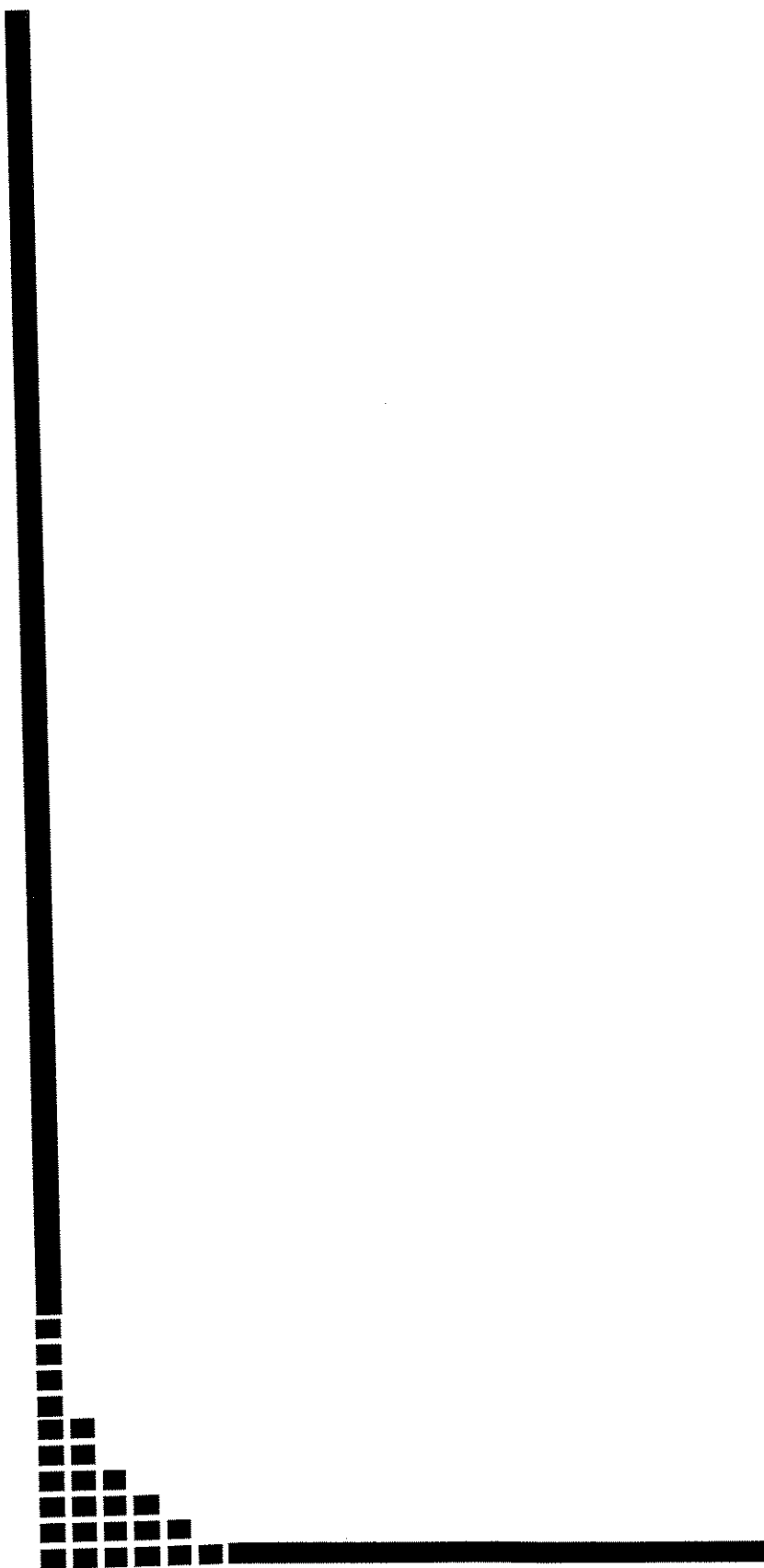
As características funcionais dos monócitos é semelhante tanto no CPP como na MO como fonte de células para o TMO (MIELCAREK, 1997; TANAKA, 1999). Portanto, a sua ação parece depender da quantidade infundida e não da diferença funcional entre os monócitos do CPP e da MO.

Não há nenhum estudo na literatura, pelo menos do nosso conhecimento, no sentido de correlacionar o número de células CD14+ da medula óssea transplantada e a frequência de GVHD.



OBJETIVOS

- Num grupo de pacientes submetidos ao TMO tendo medula óssea como fonte de células progenitoras, estudar a proporção dos diversos tipos de células no enxerto.
- Analisar a relação entre o número dos monócitos infundidos e a frequência da GVHD
- Obter o melhor ponto de corte nos diversos tipos de células do enxerto e idade do receptor que melhor dividiam em grupos com e sem GVHD
- Estudar na amostra analisada os principais parâmetros que influíram na sobrevida e na ocorrência da GVHD



PACIENTES E MÉTODOS

PACIENTES

Foram analisados retrospectivamente todos os pacientes que receberam TMO na Unidade de Transplante de Medula Óssea da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), entre setembro de 1993 até dezembro de 2000.

Foram incluídos nesse estudo os pacientes que cumpriam os seguintes critérios de inclusão para análise: dados completos sobre a composição celular do enxerto (células nucleadas, mononucleadas, CD34+, CD3, CD3/CD4, CD3/CD8, CD19 e CD14+), uma sobrevida maior que 100 dias pós TMO ou uma sobrevida menor que 100 dias quando a causa do óbito foi GVHD-A. Os dados foram correlacionados com a ocorrência da doença do enxerto-versus-hospedeiro tanto aguda como crônica. Uma explicação detalhada sobre o procedimento e as suas complicações foi dada aos pacientes e seus doadores, e um termo de consentimento, de acordo com os regulamentos da nossa instituição, foi assinado pelo paciente, pelo doador e por testemunhas.

Doadores

A MO foi obtida dos doadores pelo método padrão de coleta no centro cirúrgico sob anestesia geral. O volume aspirado foi de 10 ml/Kg de peso do receptor para as doenças neoplásicas e de 15 ml/Kg de peso do receptor para as doenças não neoplásicas.

Avaliações e definições

Os produtos da MO foram analisados para células CD34+, subtipos dos linfócitos T CD3/CD4, CD3/CD8, linfócitos B, CD19+ e CD14+. Todos os dados coletados foram analisados em equipamento de citometria de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), com software Cell Quest e com os respectivos anticorpos monoclonais.

As CNT são calculadas conforme a equação: o número de leucócitos da bolsa da medula óssea (ml), multiplicado pelo volume da bolsa e dividido pelo peso do receptor. O cálculo das CMT segue a equação: número de linfócitos e monócitos da bolsa, multiplicado pelo volume da bolsa e repartido pelo peso do receptor. Todos esses números foram obtidos em contador hematológico.

$$\text{CNT} = \frac{\text{N}^\circ \text{ leucócitos da bolsa} \times \text{Volume coletado}}{\text{Peso do receptor}}$$

Peso do receptor

$$\text{CMT} = \frac{\text{N}^\circ \text{ linfócitos e monócitos da bolsa} \times \text{Volume coletado}}{\text{Peso do receptor}}$$

Peso do receptor

Os pares de anticorpos monoclonais utilizados foram CD45 FITC/CD14 PE, CD3 FITC/CD4 PE, CD3 FITC/CD8 PE, CD3 FITC/CD19 PE, CD4 FITC/CD8 PE, CD14 FITC/IgG1 PE e CD14 FITC/CD34 PE. No citômetro de fluxo, foram adquiridos 60000 eventos e realizados os seguintes cálculos:

$\text{CD34}^{+}/\text{Kg}$ = número de eventos CD34 positivos menos o número de eventos CD34 negativos multiplicado pelo número de leucócitos por ml multiplicado pelo volume da bolsa, realizado em cima do número de eventos do “gate” e finalmente dividido pelo peso do paciente.

$$\text{CD34} = \frac{\text{N}^\circ \text{ CD34}^{+} - \text{CD34}^{-} \times \text{N}^\circ \text{ leucócitos} \times \text{Volume da bolsa}}{\text{Peso do receptor}}$$

Peso do receptor

$\text{CD3,4,8,45,19 e14}^{+}/\text{Kg}$ = número de eventos CD3,4,8,45,19 e 14 positivos multiplicado pelo número de leucócitos por ml multiplicado pelo volume da bolsa, realizado em cima do número de eventos do “gate” e finalmente dividido pelo peso do paciente.

$$\text{CD3/4/8/19/14} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Eventos}^{+} \times \text{N}^\circ \text{ leucócitos} \times \text{Volume da bolsa}}{\text{Peso do receptor}}$$

Peso do receptor

A “pega” dos neutrófilos foi definida como o primeiro dia e dois dias consecutivos com contagem absoluta dos neutrófilos $> 0,5 \times 10^9/l$, após o período de aplasia da medula óssea pelo regime de condicionamento. A “pega” das plaquetas foi definida como o primeiro dia dos 7 dias consecutivos, com contagem das plaquetas $> 20 \times 10^9/l$, sem transfusão de concentrado de plaquetas.

A avaliação e graduação da GVHD-A e GVHD-C foram realizadas segundo os critérios de Glucksberg e Shulman , respectivamente.

Grau da GVHD-A

Gravidade do envolvimento individual de órgãos

Pele

- +1: erupção maculopapular envolvendo menos do que 25% da superfície corporal (SC).
- +2: erupção maculopapular - 25-50% SC
- +3: eritrodermia generalizada.
- +4: eritrodermia generalizada com formação de bolhas e freqüente descamação.

Fígado

- +1: bilirrubina entre 2 - 3 mg/dl.
- +2: bilirrubina entre 3,1 - 6mg/dl.
- +3: bilirrubina entre 6,1 - 15 mg/dl.
- +4: bilirrubina > 15 mg/dl.

Intestino

- +1: diarreia > 500 ml/dia.
- +2: diarreia > 1000 ml/dia.
- +3: diarreia > 1500 ml/dia.
- +4: > 2000 ml/dia; ou dor acentuada.

Gravidade da GVHD-A

Grau I

- Pele +1 a +2.
- Sem envolvimento intestinal.
- Fígado não maior a +1.
- Sem piora da *performance status* ou febre.

Grau II

- Pele +1 a +3.
- Intestino +1 a +2 e/ou fígado +1 a +2.
- Diminuição leve da *performance status*.

Grau III

- Pele +2 a +4 e intestino +2 a +4, com ou sem fígado +2 a +4.
- Diminuição acentuada do *performance status*, com ou sem febre.

Grau IV

Gravidade da GVHD semelhante ao grau III, com sintomas constitucionais extremos.

Classificação da GVHD-C

Limitada

Envolvimento de pele localizada e/ou

Disfunção hepática devida à GVHD.

Extenso

Envolvimento de pele generalizada, ou

Envolvimento de pele localizada e/ou disfunção hepática devida à GVHD mais histologia hepática mostrando hepatite crônica agressiva, cirrose, ou

Envolvimento dos olhos (teste de Schimmer menor que 5mm), ou

Envolvimento de glândulas salivares ou mucosa oral demonstrados por biópsia, ou

Envolvimento de outros órgãos.

Cuidados gerais

Os cuidados de suporte foram os seguintes: os quartos eram isolados e equipados com filtros HEPA; as transfusões foram realizadas com concentrado de plaquetas e de hemácias irradiadas; utilizou-se antibiótico profilático (ciprofloxacina), de amplo espectro, e anti fúngico (fluconazol). Até final da década de 90, o antibiótico Cefetazidina e depois a Cefepime era iniciado quando a contagem dos neutrófilos era menor que $0,5 \times 10^9/l$, que não apresentassem quadro febril, todos os pacientes com doença onco-hematológica receberam ganciclovir (5mg/Kg/dia), 3 vezes por semana, como profilaxia para citomegalovírus, desde a “pega” da MO até o dia +75 pós TMO.

O suporte nutricional, incluindo nutrição parenteral periférica, foi fornecido para assegurar um balanço nutricional adequado.

Métodos estatísticos

ROC

O período de observação de todos os pacientes teve como data de corte 1º de julho de 2001. O nosso objetivo foi estudar a relação entre o número de cada tipo celular infundido e a idade e com a GVHD-A, e a GVHD-C.

Para calcularmos o ponto de melhor sensibilidade e especificidade, usamos o método denominado de ROC, “Receiver operating characteristics curve”, que foi desenvolvido para detecção de sinais para operadores de radares (ALTMAN, 1999).

Tabela exemplo

	GVHD+GVHD-	
>PONTO DE CORTE	A	B
<PONTO DE CORTE	C	D

$$\text{SENSIBILIDADE} = A/A+C$$

$$\text{ESPECIFICIDADE} = D/B+D$$

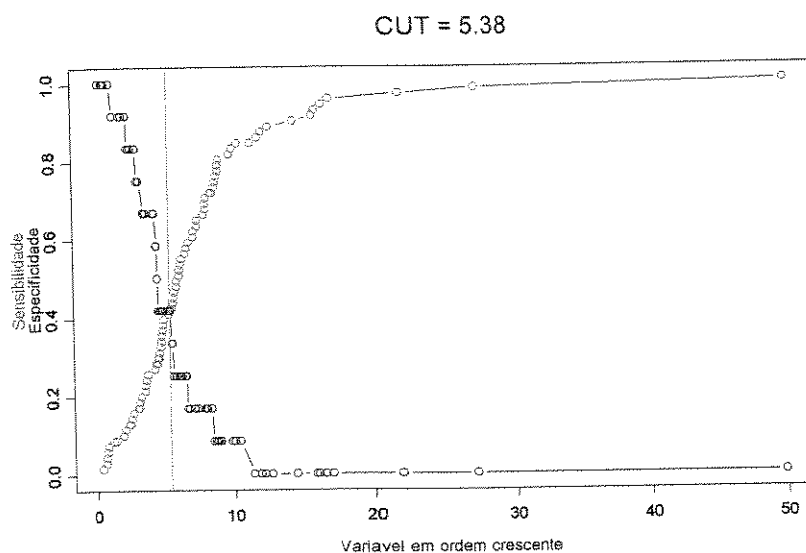


Figura 5: Curva de sensibilidade e especificidade, para exemplo do método ROC na escolha do ponto de corte das variáveis analisadas

Para cada ponto da variável contínua é construída uma tabela igual à do exemplo acima. Dessa maneira, para cada ponto da variável contínua temos um valor para a curva de sensibilidade e outro ponto para a curva de especificidade. Assim, construímos as duas curvas. O ponto de cruzamento dessas duas curvas foi o ponto de corte utilizado em nosso trabalho.

Análises estatísticas e curvas de sobrevida

Usamos o método da regressão logística para avaliar a influência das variáveis clínicas e das variáveis referentes aos tipos celulares na ocorrência da GVHD aguda e crônica.

Os modelos parciais foram comparados por meio da análise de variância, utilizando-se o teste de χ^2 . Todos os valores de P eram “bicaudais”. Foram considerados significantes os valores de $P < 0,05$.

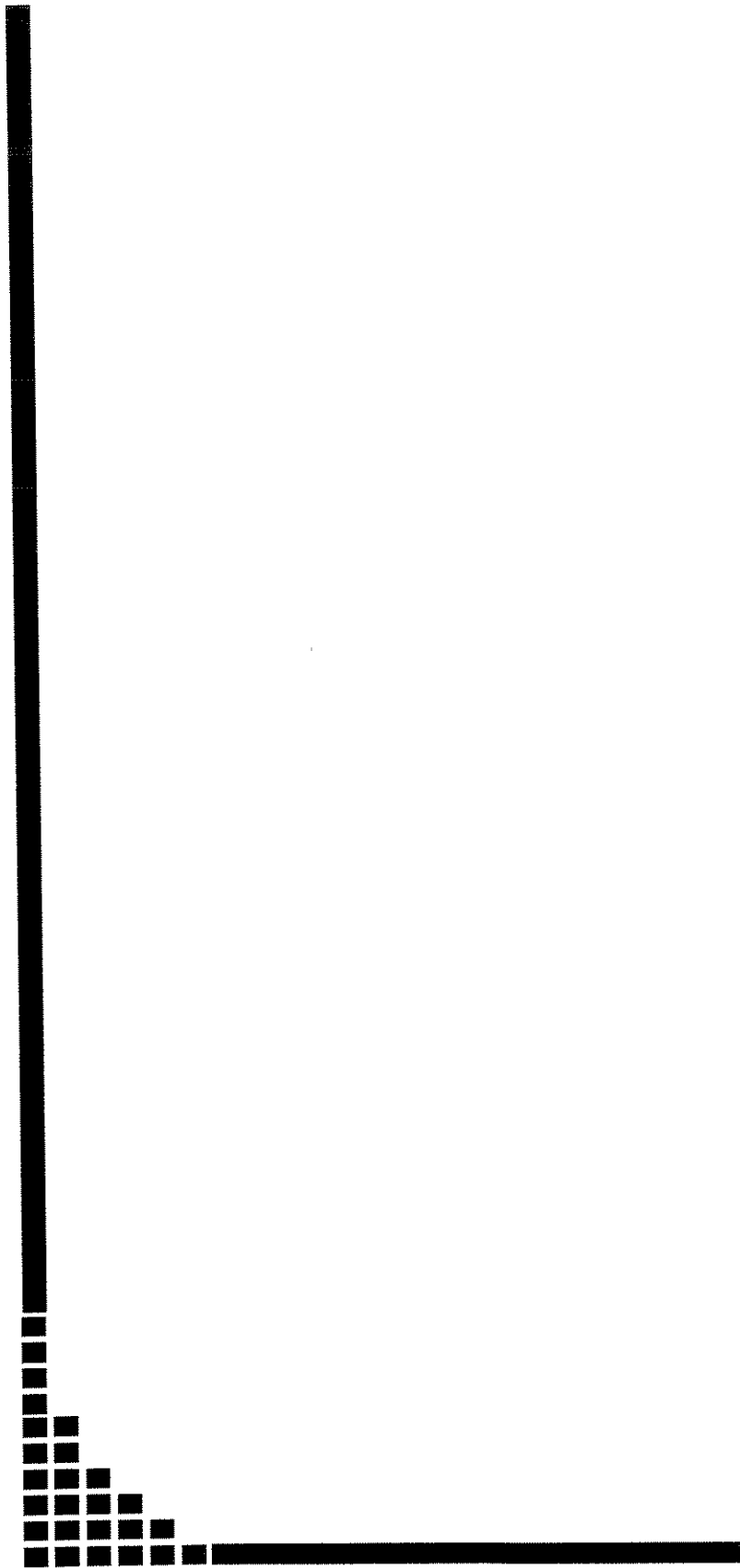
Para cada modelo, calculamos a razão de chance, o intervalo de confiança e a probabilidade de ocorrência do evento.

A análise multivariada foi realizada por meio da análise de variância utilizando-se o teste de χ^2 , para as variáveis que foram significativas no modelo parcial. Todos os valores de P eram “bicaudais”. Foram considerados significantes os valores de $P < 0,05$. E a probabilidade de ocorrência do evento foi calculada.

Para as variáveis de tempo — a sobrevida global — utilizamos o modelo de regressão de Cox, empregando o teste da razão da verossimilhança. Calculamos o risco relativo e o intervalo de confiança, considerados significantes os valores de $P < 0,05$.

O teste da correlação de Spearman foi realizado para demonstrar a penetração entre as variáveis. Somente para as variáveis do tipo celulares. Quando essa correlação era maior que 0,50 consideramos que havia uma relação entre as variáveis.

As curvas de probabilidade de sobrevida global e estratificadas pela GVHD-A e GVHD-C foram construídas pelo método de Kaplan-Meier. Para compararmos curvas de sobrevida realizamos o teste de “log rank”. Quando o valor de P foi menor que 0,05, foi considerado como diferença estatística significativa.



CONCLUSÕES

Entre setembro de 1993 e dezembro de 2000, avaliamos 83 pacientes, que foram incluídos no estudo.

A mediana de seguimento dos pacientes foi de 696 dias (33-2278). Até a data de corte, 1º de julho de 2001, 70% desses pacientes estavam vivos. Os diagnósticos mais freqüentes foram LMC, AA e LMA, perfazendo 83% dos pacientes. A maioria dos pacientes eram do sexo masculino (75%). Houve paridade entre os doadores do sexo masculino e feminino. 37% dos transplantes foram entre doadores e receptores do sexo masculinos e 37% entre doador do sexo masculino e receptor do sexo feminino. As características dos pacientes, dos doadores e as características do tratamento são mostradas na Tabela 1 e 2.

A Tabela 3 é um sumário da composição do enxerto infundido nos transplantes de medula óssea e seus diversos tipos de células.

As características de “pega” dos granulócitos e das plaquetas e o tempo de hospitalização dos pacientes estudados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 1: Dados clínicos pré-TMO dos 83 pacientes submetidos ao TMO

Pacientes (n°)	83
Idade anos, mediana (min-max)	27,5 (3,4-59,3)
Sexo paciente n°(%)	M=62 (75%)
	F=21 (25%)
Sexo doador n°(%)	M=40 (48%)
	F=43 (52%)
Sexo doador → Sexo paciente n°(%)	M→M=31 (37%)
	F→F=12 (15%)
	M→F=31 (37%)
	F→M=9 (11%)
Diagnóstico n (%)	
LMC	39 (47%)
AA	18 (22%)
LMA	11 (14%)
SMD	4 (5%)
LLA	6 (7%)
MM	2 (2%)
Diseritropoese congênita	2 (2%)
LNH	1 (1%)

LMC- leucemia mielóide crônica; **AA-** anemia aplástica; **LMA-** leucemia mielóide aguda; **SMD-** síndrome mielodisplásica; **LLA-** leucemia linfóide aguda; **MM-** mieloma múltiplo; **LNH-** linfoma não Hodgkin; **n°**- número; **%-** porcentagem

Tabela 2: Dados clínicos, tipo de condicionamento e profilaxia para GVHD-A pós TMO

Vivos n (%)	58 (70%)
Mortos n (%)	25 (30%)
Tempo de sobrevida dias (min-max)	696 (33-2278)
Regimes mieloablativos	
BU+CY n° (%)	67 (81%)
Outros n° (%)	16 (19%)
Profilaxia GVHD	
MTX+CSPA n° (%)	76 (91%)
CSPA+Corticóide n° (%)	4 (5%)
CSPA n° (%)	3 (4%)

BU- bussulfan; CY- ciclofosfamida; MTX- metotrexate; CSPA- ciclosporina

Tabela 3: Características das células do enxerto em 83 pacientes

Tipo células	Mediana (min-max)
CNT (x10⁸)	2,64 (1,46-5,74)
CMT (x10⁸)	1,16 (0,45-2,25)
CD34/Kg (x10⁶)	4,26 (0,57-29,36)
CD3/Kg (x10⁶)	37,75 (13,21-170)
CD4/Kg (x10⁶)	19,6 (8,04-78)
CD8/Kg (x10⁶)	15,63 (5,19-97,48)
CD19/Kg (x10⁶)	16,1 (3,36-179,2)
CD14/Kg (x10⁶)	5,73 (0,4-49,86)

CNT- células nucleadas totais; CMT- células mononucleadas totais

Tabela 4: Dados da “pega” do enxerto e o tempo de hospitalização [mediana (min-max)] em dias

“Pega” neutrófilos	20 (11-34)
“Pega” plaquetas	19 (10-60)
Hospitalização	26 (14-49)

A pega de neutrófilos e de plaquetas foram praticamente sem diferenças, houve pega mais rápida em 1 dia para os granulócitos.

A Tabela 5, mostra o teste de Spearman para a correlação entre as variáveis.

Tabela 5: Teste de Spearman para correlação entre as células do enxerto

	CNT	MNT	CD34	CD3	CD4	CD8	CD19	CD14
CNT		0,83	0,15	0,06	0,08	0,05	0,30	0,48
MNT			0,13	0,12	0,14	0,10	0,27	0,31
CD34				0,52	0,50	0,50	0,59	0,20
CD3					0,93	0,94	0,56	0,06
CD4						0,84	0,52	0,04
CD8							0,57	0,07
CD19								0,15
CD14								

CNT- células nucleadas totais; MNT- células mononucleadas totais

Os resultados da análise univariada estudando a influência de cada tipo de célula no enxerto, bem como os dados demográficos, estão na Tabela 6. Nenhum dos parâmetros estudados apresenta relação com a “pega”.

Tabela 6 : Análise univariada da “pega” dos neutrófilos e das plaquetas (P)

	“PEGA” ENXERTO	
	NEUTRÓFILOS	PLAQUETAS
Idade	0,13	0,65
Sexo receptor	0,09	0,39
Sexo doador	0,08	0,21
Sexo doador→Sexo receptor	0,65	0,65
CNT	0,11	0,06
CMT	0,31	0,30
CD34 /Kg (x10⁶)	0,80	0,32
CD3/Kg (x10⁶)	0,97	0,62
CD4/Kg (x10⁶)	0,97	0,77
CD8/Kg (x10⁶)	0,89	0,85
CD19/Kg (x10⁶)	0,54	0,33
CD14/Kg (x10⁶)	0,99	0,50
Maligna x Não maligna	0,20	0,43

CNT- células nucleadas totais; CMT- células mononucleadas totais; Maligna- doença onco-hematológica; Não maligna- doença não oncológica

Doença do enxerto-versus-hospedeiro aguda e crônica

Entre os pacientes avaliados, 12 tiveram GVHD-A grau II a IV (Tabela 7). Destes 10 tiveram GVHD grau III e IV (10/12, 83%).

A frequência da GVHD-C foi de 31/77 pacientes (40%), sendo avaliada como extensa em 20 deles. Como doença limitada tivemos 11/31 (35%).

Tabela 7: Frequência de GVHD-A e GVHD-C

GVHD-A n° Avaliados	83
Grau II-IV n° (%)	12/83 (14,5%)
GVHD-C n° Avaliados	77
Total afetado n° (%)	31/77 (40%)

Análise univariada e multivariada - GVHD-A e GVHD-C

A Tabela 8 contém os pontos para cada tipo de célula do enxerto utilizando o método denominado de ROC.

Tabela 8: Pontos de corte para cada célula

	GVHD-A	GVHD-C
Idade (anos)	27,2	26,8
CNT (x10 ⁸)	2,31	2,685
CMT (x10 ⁸)	1,065	1,095
CD34 (x10 ⁶)	3,96	3,94
CD3 (x10 ⁶)	40,95	35,60
CD4 (x10 ⁶)	19,535	19,28
CD8 (x10 ⁶)	16,715	15,485
CD19 (x10 ⁶)	15,135	15,475
CD14 (x10 ⁶)	4,78	5,81

CNT- células nucleadas totais; CMT- células mononucleadas totais

Na Tabela 9 estão os dados da análise univariada examinando a influência dos dados demográficos, bem como dos componentes do enxerto sobre a GVHD aguda. A idade, disparidade de sexo entre doador e receptor, CNT e as células CD14+ foram significativas neste modelo.

A probabilidade dos pacientes com idade menor do que a do corte (27 anos) apresentarem GVHD-A foi de 8%. Quando os pacientes receberam no TMO número de células maior que o ponto de corte, para as CNT e CD14+, a probabilidade de apresentarem GVHD-A foi de 7% para as duas variáveis.

Entre doadores e receptores com o mesmo sexo, a probabilidade de apresentarem GVHD-A foi de 0,7%. Quando o doador e o receptor de medula óssea tiveram sexos diferentes a probabilidade de adquirirem GVHD-A foi de 4,6%. O maior risco para a presença da GVHD-A foi quando o doador era do sexo feminino e o receptor do sexo masculino. O risco nesse caso foi de 33%, isto é, 15 vezes maior do que quando comparado com o TMO realizado entre doador e receptor do sexo masculino. O risco da GVHD-A entre doador masculino e receptor feminino foi 9 vezes maior em relação ao TMO realizado quando o pareamento foi de masculino para masculino, a probabilidade foi de 22%.

Na análise multivariada, as únicas variáveis que permaneceram importantes foram as CNT e a idade do receptor para um menor risco de GVHD. A probabilidade foi de 3,2% para idade menor que 27 anos e quantidade das CNT infundidas maior que o ponto de corte. Um maior risco de GVHD-A com uma probabilidade de 51,5% ocorreu quando a idade era maior que 27 anos e a quantidade das CNT infundidas menor que $2,31 \times 10^8/\text{Kg}$ de peso do receptor.

Encontramos uma relação de 7,20 entre CD3:CD14. Quando separamos os pacientes em dois grupos — que receberam células CD14+ em maior e menor quantidade que o ponto de corte — verificamos que a relação foi de 5,84 no primeiro e de 14,75 no segundo. O grupo que recebeu mais células CD14+ teve aproximadamente 3 vezes mais monócitos que o outro grupo.

Tabela 9: Análise univariada através da regressão logística em relação a ocorrência GVHD-A em 83 pacientes

	<i>P</i>	RR	IC
Idade	0,03	0,26	0,07-0,93
Sexo de receptor	0,50	1,59	0,43-5,93
Sexo do doador	0,26	2,05	0,57-7,44
Sexo doador → Sexo receptor	0,04	6,83	1,40-33,45
CNT	0,004	0,15	0,04-0,58
CMT	0,26	0,49	0,14-1,70
CD34/Kg (x10⁶)	0,26	0,49	0,14-1,70
CD3/Kg (x10⁶)	0,30	1,91	0,55-6,60
CD4/Kg (x10⁶)	0,90	0,97	0,28-3,30
CD8/Kg (x10⁶)	0,39	1,71	0,50-5,89
CD19/Kg (x10⁶)	0,19	0,49	0,14-1,71
CD14/Kg (x10⁶)	0,02	0,24	0,07-0,87
Maligna x Não maligna	0,94	0,94	0,23-3,89

CNT- células nucleadas totais; CMT- células mononucleadas totais; Maligna- doença onco-hematológica; Não maligna- doença não oncológica

Na Tabela 10 estão os dados da análise univariada examinando a influência dos dados demográficos, bem como dos componente do enxerto sobre a GVHD crônica. O único fator de risco encontrado foi o antecedente de GVHD-A. Nesse grupo a probabilidade de adquirir GVHD-C foi de 71%.

Tabela 10: Análise univariada através da regressão logística em relação a ocorrência GVHD-C em 83 pacientes

	<i>P</i>	RR	IC
Idade	0,13	2,22	0,79-6,26
Sexo de receptor	0,52	1,45	0,46-4,53
Sexo do doador	0,10	2,38	0,83-6,82
Sexo doador → Sexo receptor	0,45	9,17	0,82-4,05
CNT	0,84	1,11	0,40-3,08
CMT	0,17	0,48	0,17-1,39
CD34/Kg (x10⁶)	0,09	0,42	0,14-1,18
CD3/Kg (x10⁶)	0,95	0,97	0,35-2,67
CD4/Kg (x10⁶)	0,39	0,64	0,30-1,78
CD8/Kg (x10⁶)	0,95	0,97	0,35-2,67
CD19/Kg (x10⁶)	0,74	0,84	0,30-2,32
CD14/Kg (x10⁶)	0,39	0,64	0,23-2,32
GVHD-A	0,008	9,17	1,62-52
Maligna x Não maligna	0,23	2,21	0,57-8,50

CNT- células nucleadas totais; CMT- células mononucleadas totais; Maligna- doença onco-hematológica; Não maligna- doença não oncológica

As figuras 2 e 3 são as representações das variáveis que foram significantes na análise univariada das variáveis (as CNT e as células CD14+). Há uma evidência gráfica importante de que os pacientes que receberam maior número dessas células foram os do grupo sem GVHD-A.

A figura 6 é o “boxplot” das células nucleadas versus a presença ou não da GVHD-A. A mediana, o intervalo de confiança para cada grupo, um sem e outro com GVHD-A, foi de $280 \times 10^6/\text{Kg}$ de peso do receptor (IC=276 a 324) e de $216 \times 10^6/\text{Kg}$ de peso do receptor (IC=184 a 291), respectivamente.

A figura 7 é o “boxplot” das células CD14+ versus a presença ou não da GVHD-A. A mediana, o intervalo de confiança para cada grupo, um sem e outro com GVHD-A, foi de $6,11 \times 10^6/\text{Kg}$ de peso do receptor (IC=6,07 a 9,39) e de $4,16 \times 10^6/\text{Kg}$ de peso do receptor (IC=2,88 a 5,89), respectivamente.

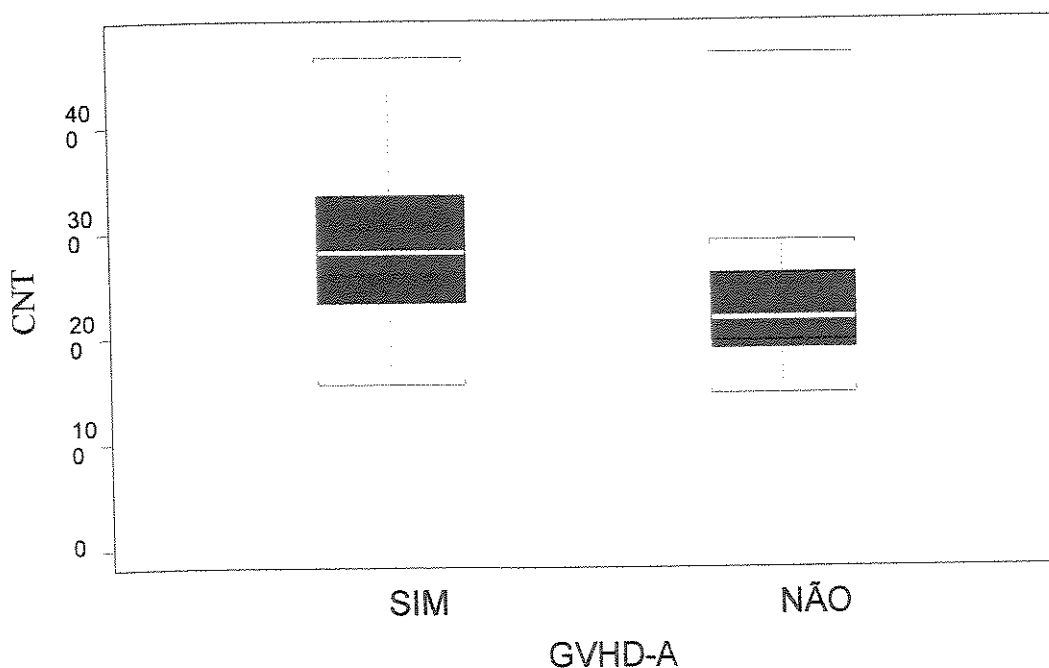


Figura 6: Boxplot da regressão logística em relação à GVHD-A, para CNT

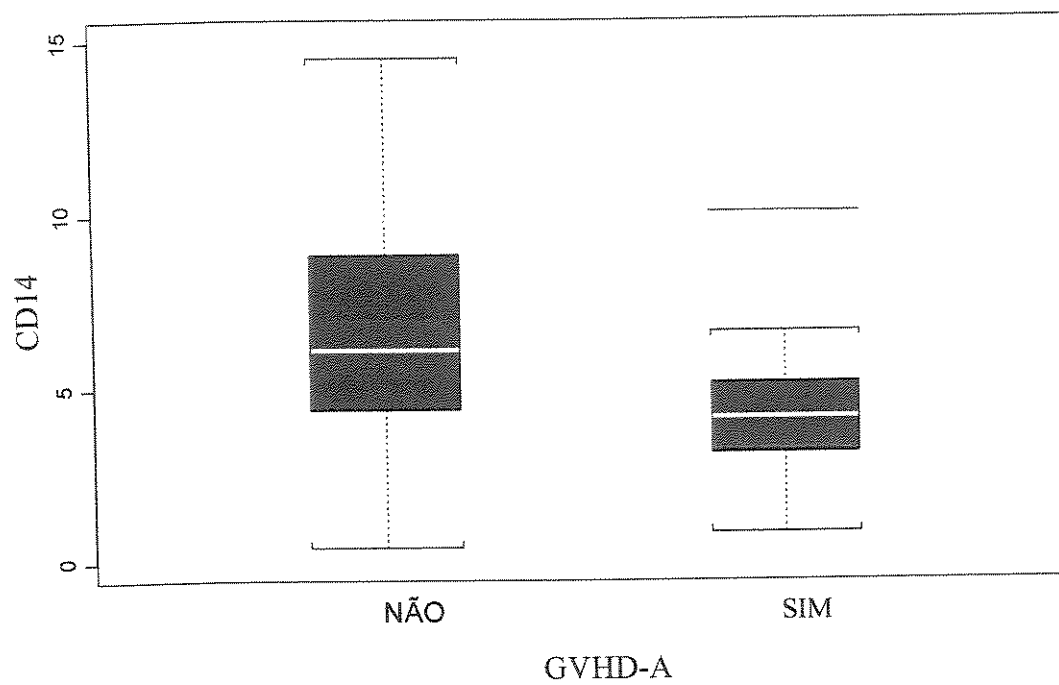


Figura 7: Boxplot da regressão logística em relação à GVHD-A, para CD 14

Análise da sobrevida

A análise das relações entre as células, a GVHD-A, a GVHD-C, os dados clínicos do receptor, o dia de “pega” dos granulócitos e das plaquetas com a sobrevida global estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11: Análise da sobrevida global com modelo de Cox em 83 pacientes

	<i>P</i>	RR	IC
Idade	0,20	1,02	0,99-1,05
Sexo de receptor	0,20	0,50	0,17-1,46
Sexo do doador	0,53	1,29	0,58-2,83
Sexo doador → Sexo receptor	0,32	1,48	0,67-3,27
CNT	0,45	1,00	0,99-1,01
CMT	0,91	1,00	0,99-1,01
CD34/Kg (x10⁶)	0,06	1,06	1,00-1,14
CD3/Kg (x10⁶)	0,15	1,01	0,99-1,02
CD4/Kg (x10⁶)	0,22	1,01	0,99-1,04
CD8/Kg (x10⁶)	0,17	1,01	0,99-1,03
CD19/Kg (x10⁶)	0,32	1,01	0,99-1,02
CD14/Kg (x10⁶)	0,89	0,89	0,94-1,07
“Pega” granulócitos	0,99	1,00	0,94-1,07
“Pega”plaquetas	0,39	1,02	0,98-1,05
GVHD-A	0,008	2,57	1,70-3,88
GVHD-C	0,37	1,24	0,78-1,96
Maligna x Não maligna	0,53	1,37	0,51-3,64

CNT- células nucleadas totais; **CMT-** células mononucleadas totais; **Maligna-** doença onco-hematológica; **Não maligna-** doença não oncológica

A figura 8 é a representação da sobrevida global para o TMO desses pacientes, com sobrevida global de 66 %.

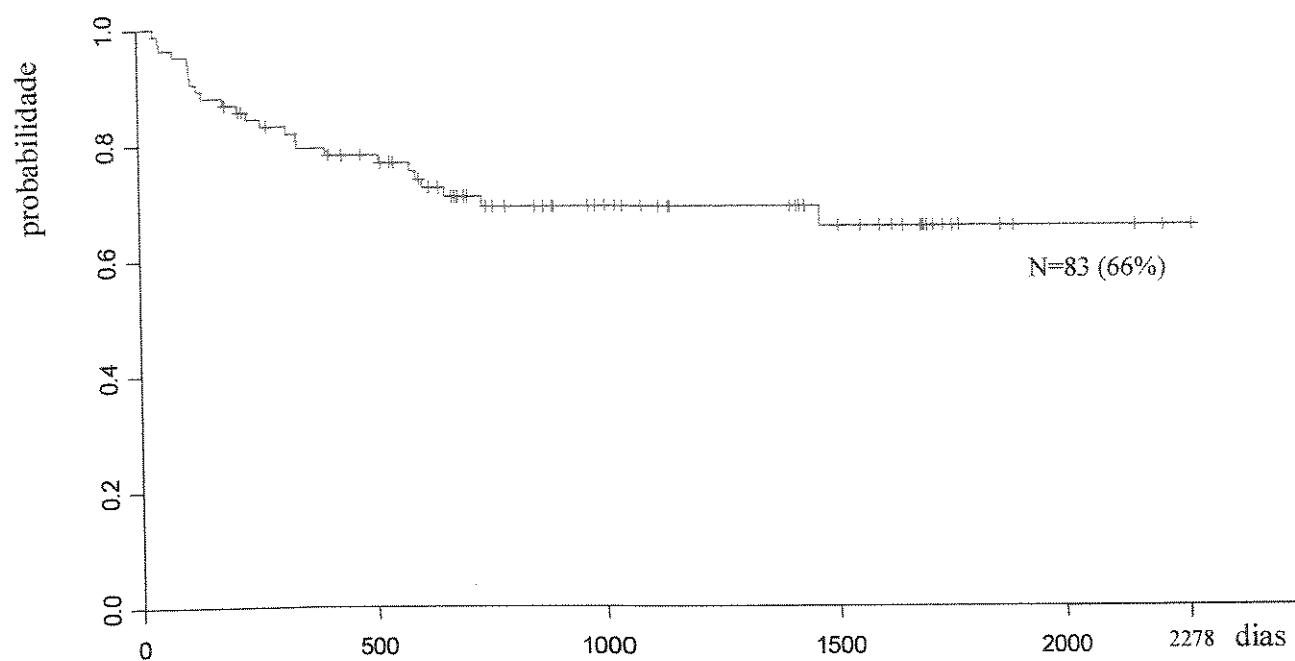


Figura 8: Sobrevida global - MO

A figura 9 representa as curvas de sobrevida global estratificadas pela GVHD-A. Evidenciamos diferenças entre as curvas construídas quando estratificamos para essa variável de interesse. A sobrevida no grupo com GVHD-A foi de 25% e no grupo sem GVHD-A foi de 73%, com $P<0,001$.

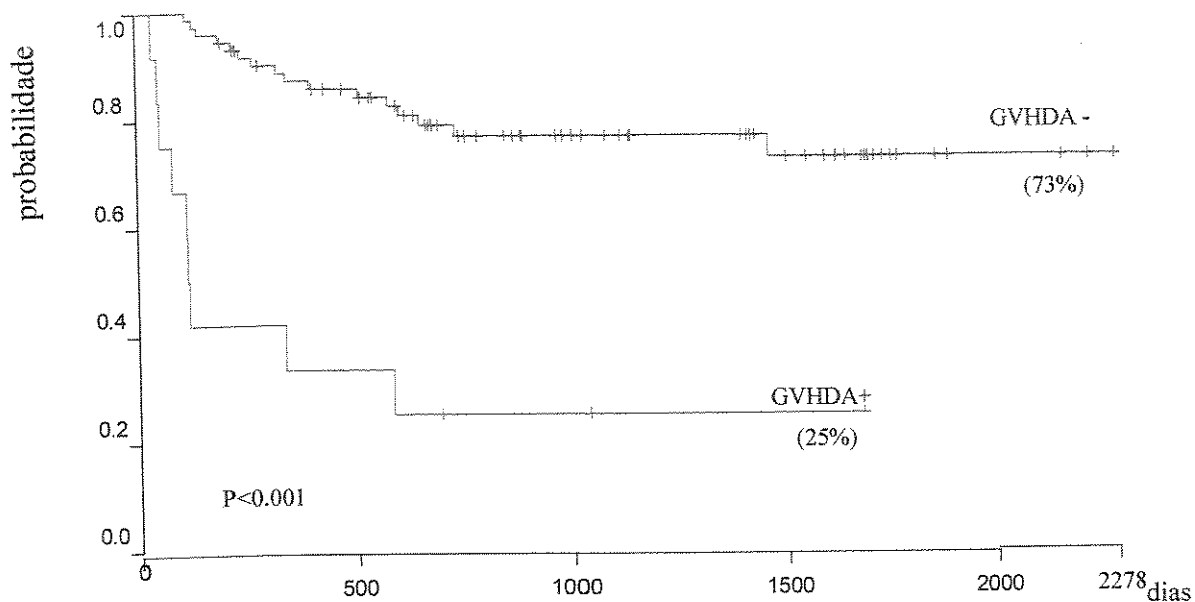


Figura 9: Sobrevida global x GVHD-A

A figura 10 mostra as curvas de sobrevida global estratificadas pela GVHD-C. Para a variável GVHD-C encontramos $P= 0,37$, sem diferença entre as curvas, com sobrevida de 73% e de 61% em cada grupo respectivamente, com e sem GVHD-C.

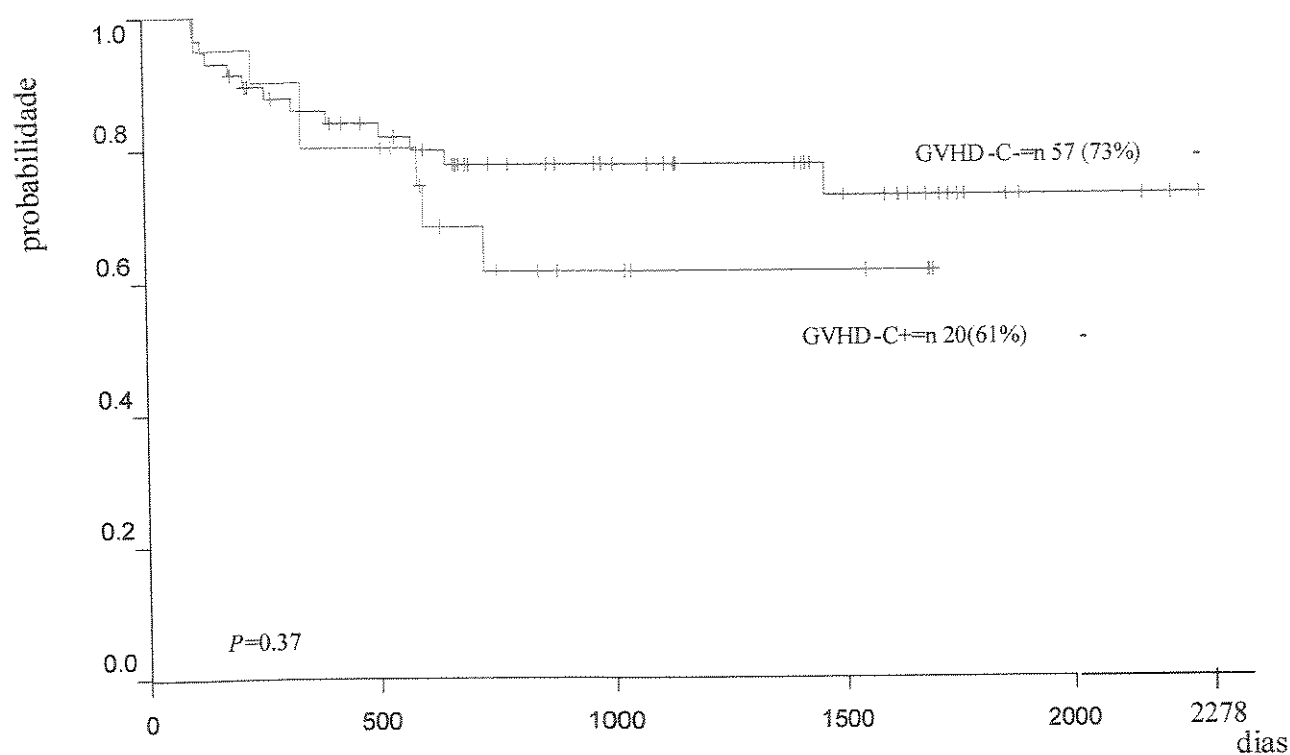


Figura 10: Sobrevida global x GVHD-C

Na figura 11, a probabilidade de ocorrer GVHD-A, que foi de 14,5%, dos 83 pacientes avaliados. Houve 12 eventos e a mediana foi de 100 dias (21-100).

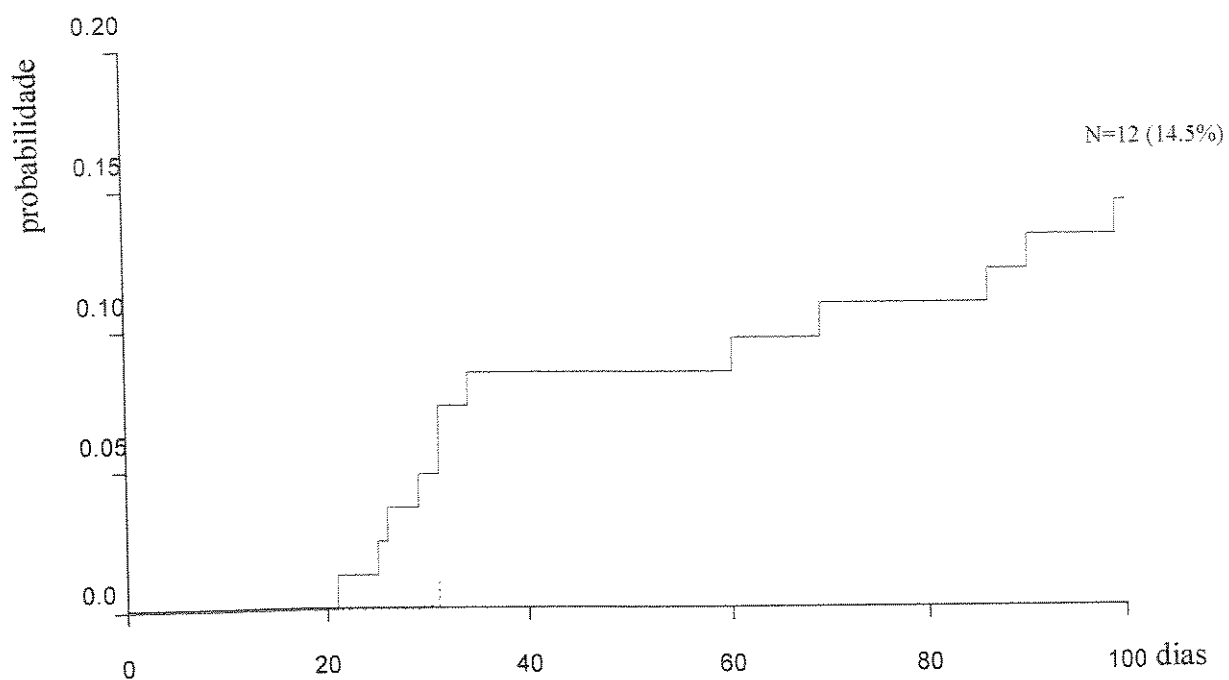


Figura 11: Probabilidade de ocorrer GVHD-A grau II - IV

Na figura 12, a probabilidade de ocorrer GVHD-C que foi de 50%, dos 70 pacientes avaliados. Houve 20 eventos e a mediana foi de 378 dias (101-2278).

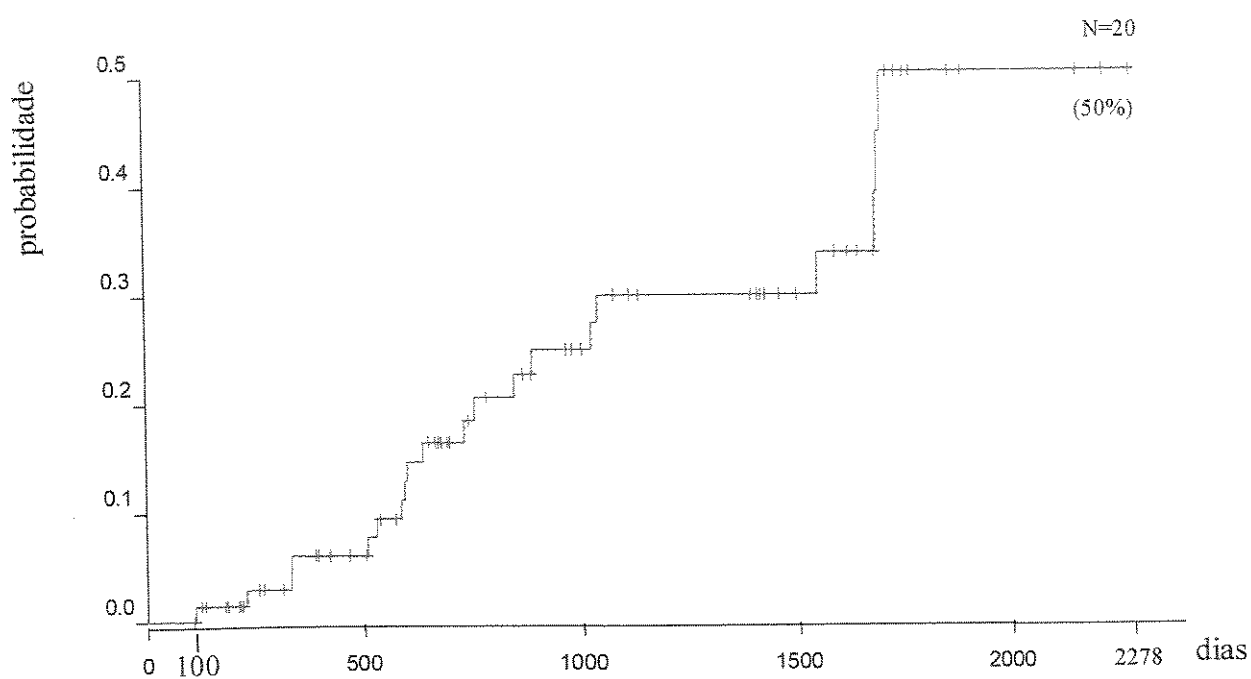
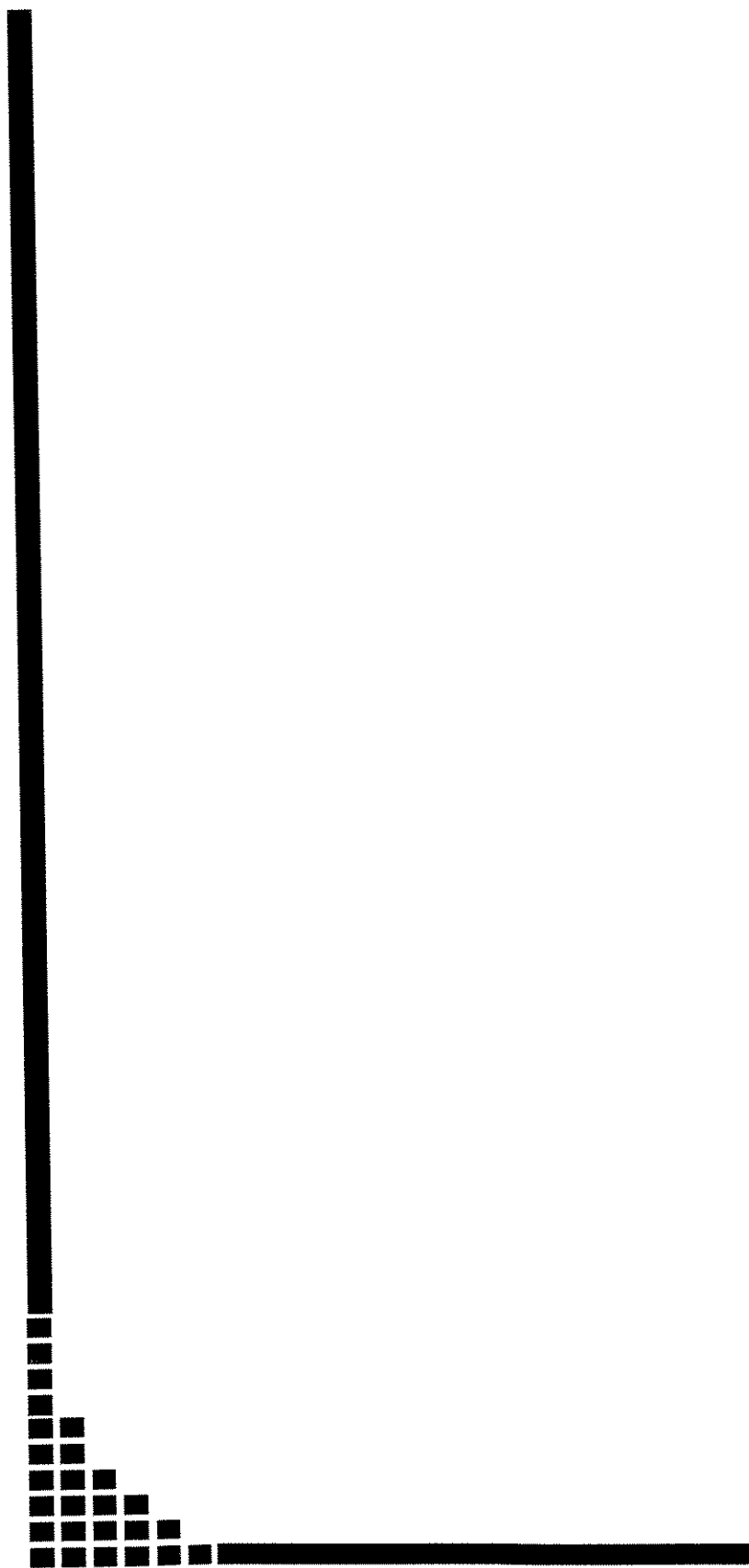


Figura 12: Probabilidade de ocorrer GVHD-C extenso



DISCUSSÃO

Esse estudo foi idealizado para analisar as diversas características do enxerto no TMO alogênico, utilizado como fonte de célula hematopoética a medula óssea, sua influência em relação à “pega” do enxerto e a correlação com a GVHD-A e a GVHD-C. O objetivo central foi avaliar, principalmente, o comportamento das células CD14+ do enxerto e o efeito sobre a GVHD. O racional desse estudo partiu da possibilidade potencial dos monócitos exercerem alguma ação protetora contra a GVHD-A, como nos transplantes por CPP (MIELCAREK, 1996, VIGORITO, 1998, BENSINGER, 2001; VIGORITO, 2001, ZAUCHA JM, 2001). A ação dos monócitos é semelhante tanto no CPP como no MO como fonte de células para o TMO quando infundidos em quantidades iguais (MIELCAREK, 1997; TANAKA, 1999). Portanto, a sua ação parece depender da quantidade infundida e não da diferença funcional entre os monócitos do CPP e da MO.

Não há nenhum estudo na literatura, pelo menos do nosso conhecimento, no sentido de correlacionar as células CD14+ da medula óssea e GVHD.

GVHD-crônica

A GVHD-C tem aumentado em freqüência, sendo um dos grandes problemas clínicos atualmente na prática do TMO (ARAI, 2000). A melhora da terapêutica para as complicações peri-transplante com aumento da sobrevida, a realização do TMO com doador não aparentado e o CPP como fonte de células hematopoética, são alguns dos motivos para o aumento da freqüência da GVHD-C (VIGORITO, 1998; ARAI, 2000).

Analisando os nossos pacientes em relação à GVHD-C, a mediana de tempo para aparecimento de 230 dias (101-712 dias) e encontramos como único fator de risco a presença da GVHD-A.

Essa forte associação com a GVHD-C nos pacientes que apresentaram GVHD-A já foi relatada em outros estudos (STORB, 1983; TKINSON, 1990; BOSTRÖM, 1990).

A idade é um outro fator de risco importante para a GVHD-C. Quanto maior a idade do receptor, maior o risco de desenvolvê-lo (ATKINSON, 1990; STORB, 1983; BOSTRÖM, 1990).

Quando o paciente não apresenta GVHD-A ou GVHD-A grau I, os riscos para a presença da GVHD-C são: a idade maior que 20 anos, a utilização do enxerto sem os linfócitos T e disparidade do sexo entre doador e receptor. A GVHD-A grau II a IV é o único fator de risco para a presença da GVHD-C e não depende de outros fatores adicionais. O nosso estudo confirma esses dados anteriormente apresentados. (GALE, 1987; ATKINSON, 1990; SULLIVAN, 1991; WAGNER, 2000).

Um outro fator de risco para a GVHD-C é o diagnóstico de doença maligna, principalmente a LMC, que é a grande maioria dos casos indicados e transplantados por nós. Böstrom et al (1990) acreditam que a esplenectomia realizada nesses pacientes aumenta o risco da GVHD-A, conseqüentemente aumenta a freqüência da GVHD-C. Atualmente acredita-se que o tratamento anterior com interferon aumentaria a expressão das moléculas de adesão e aumentaria o risco de GVHD (CARLENS, 1998). Os nossos pacientes foram tratados, em quase sua totalidade, com hidroxiuréia (HYDREA®) e nenhum havia sido submetido à esplenectomia. Portanto, não há entre os nossos pacientes nenhum fator de risco anterior que pudesse aumentar a probabilidade da ocorrência da GVHD-C.

Tivemos 20 casos com a GVHD-C extenso. Entre esses pacientes não há outros fatores preditivos da ocorrência da GVHD-C, além da própria GVHD-A. A grande freqüência de pacientes com GVHD-A grau II a IV nos nossos casos deve ser uma das explicações para o único fator de risco encontrado para a GVHD-C (ATKINSON, 1990).

GVHD-aguda

Atualmente há várias modalidades de profilaxia e tratamento para a prevenção e o controle da GVHD-A, esta continua a ser uma das maiores complicações após o TMO. A GVHD-A pode ocorrer até três meses após o TMO. Os principais órgãos envolvidos são a pele, o TGI e o fígado (FERRARA, 1991; ARAI, 2000).

Encontramos nesse trabalho uma relação entre os números das células CD14+ infundidas e a GVHD-A. Os pacientes que receberam células acima do ponto de corte, isto é, $4,78 \times 10^6$ / Kg de peso do receptor, apresentaram um risco para a GVHD-A 4 vezes menor que o outro grupo.

O transplante alogênico utilizando CPP contém 10 vezes mais células T quando comparado ao TMO. Entretanto, a prevalência e a gravidade da GVHD-A após o transplante com CPP não são diferentes daquela observada com MO (VIGORITO, 1998; BENSINGER, 2001; VIGORITO, 2001). Isto pode ser explicado por um efeito direto do G-CSF sobre a função das células T, polarizando as células Th1 em direção de Th2, com secreção de citocinas antiinflamatórias (PAN, 1995).

O CPP contém 50 vezes mais células CD14+ quando comparadas ao TMO (MIELCAREK, 1996, MIELCAREK, 1997). São células que podem suprimir a resposta das células T alogênicas (MIELCAREK, 1997; INO, 1997; NAWA, 1997; TANAKA, 1999). No CPP, as células CD14+ podem inibir a proliferação das células T do doador e essa inibição é dose dependente (MIELCAREK, 1997; TANAKA, 1999). As células CD14+ quando usadas em quantidades comparáveis podem suprimir a resposta das células T, independentemente da fonte de células utilizadas no transplante (MIELCAREK, 1997; TANAKA, 1999).

Os monócitos não aumentam a resposta imunológica somente como células apresentadoras de antígeno (MUNN, 1996; MIELCAREK, 1998). Demonstrou-se também que há aumento da produção de IL-10 pelos monócitos e inibição da resposta das células T (MUNN, 1996; MIELCAREK, 1998). A depleção dos monócitos pode restaurar as propriedades proliferativas e funcionais das células T e NK (AGEITOS, 1997). Aqueles indivíduos — com predisposição genética — que expressam baixos níveis de IL-10 e altos níveis de TNF α detectou-se maior frequência de GVHD-A e, portanto, maior mortalidade em relação aos indivíduos que expressavam altos níveis de IL-10 e baixos níveis de TNF α (CAVET, 1999; HOLLER, 2000).

Mielcarek et al (1997) observaram que a relação entre as células CD3 e CD14 é muito importante no efeito supressivo dos monócitos sobre os linfócitos T. No seu estudo compararam a relação CD3:CD14 no CPP, no TMO e no sangue periférico. Constataram que no CPP há cinco vezes mais monócitos em relação aos outros grupos. No sangue periférico e TMO a relação entre CD3:CD14 são comparáveis (MIELCAREK, 1997; TANAKA, 1999).

Neste presente trabalho encontrou-se a relação entre CD3:CD14 igual a 7,20. Quando separados em dois grupos que receberam células CD14+ em maior e menor quantidade que o ponto de corte, verificou-se que no grupo que recebeu menor quantidade de células CD14+ a relação CD3:CD14 foi de 14,75 e no grupo que recebeu maior quantidade de células CD14+ a relação CD3:CD14 foi de 5,84. Portanto, o grupo que recebeu maior número de células CD14+ teve aproximadamente 3 vezes mais monócitos em relação ao outro grupo.

Nestes pacientes, verificou-se que o grupo sem GVHD recebeu mais células CD14+ e apresentou uma relação CD3:CD14 menor. Portanto, esse dado está de acordo com os achados anteriormente encontrados (MIELCAREK, 1997; TANAKA, 1999). E parece provável o efeito imunossupressor dos monócitos sobre as células T alogênicas. Podemos também afirmar que quanto maior o número de células CD14+ infundidas no TMO maior seria seu efeito imunossupressor. O efeito dos monócitos é, portanto, dose dependente e com a mesma capacidade funcional tanto no CPP quanto na MO, como já foi relatado por outros autores (MIELCAREK, 1997; TANAKA, 1999).

A idade é um fator de risco para a GVHD-A previamente estabelecido (BROSS, 1984; GALE, 1987; WEISDORF, 1991). Nesse estudo também encontrou-se a idade como fator de risco para GVHD-A. Utilizou-se essa variável como categórica e o ponto de corte foi de 27 anos, próxima à mediana das idades dos nossos pacientes. Esse ponto de corte alto pode ser responsável por essa associação, pois se sabe que acima dos 20 anos há maior risco de GVHD-A. Realmente deve-se sempre pensar na idade como fator de risco. Pois, reconhecidamente, os pacientes com mais idade apresentam maior risco de terem GVHD-A (BROSS, 1984; GALE, 1987; WEISDORF, 1991).

Outro fator de risco encontrado por nós foi a incompatibilidade entre sexo do doador e receptor, principalmente quando o transplante é realizado entre doador do sexo feminino e receptor do sexo masculino ($P=0,04$). O maior risco de GVHD-A deve-se às gravidezes anteriores das doadoras, quando as mulheres podem ser sensibilizadas pelo feto, e somando-se a maior idade da doadora como causa de risco aumentado de GVHD-A (BROSS, 1984; ATKINSON, 1986; WEISDORF D, 1991; NASH, 1992).

Encontramos que a infusão das CNT maior que $2,31 \times 10^8/\text{Kg}$ de peso do receptor (ponto de corte), diminui a probabilidade de GVHD-A.

Przepiorka et al (1999), afirmaram que a maior quantidade de CNT infundida se relaciona com uma sobrevida melhor, devida a uma diminuição na incidência de pneumonite intersticial e outras complicações relacionadas ao período inicial do TMO. Em vários estudos, as CNT não foram identificadas como fator de risco independente para a GVHD-A após o TMO HLA idêntico (BROSS, 1984; GALE, 1987). Os estudos que não relacionam CNT com GVHD são antigos. Os únicos dois estudos que mostram essa associação são o de Morariu-Zamfir e o presente estudo, ambos realizados em 2001.

Na análise multivariada, a interação das CNT e a idade do receptor apresentaram associação com menor risco de GVHD. A probabilidade era de 3,2% quando a idade era menor que 27 anos e a quantidade de CNT infundida era maior que o ponto de corte. Houve um maior risco de GVHD-A com uma probabilidade de 51,5% quando a idade era maior que 27 anos e a quantidade de CNT infundida era menor que $2,31 \times 10^8/\text{Kg}$ de peso do receptor.

As outras variáveis que foram significativas na análise univariada não foram importantes no modelo de análise multivariada.

Na análise multivariada somente as CNT e a idade mantiveram significado estatístico.

As células CD14+ apresentaram uma forte interação com as CNT. Apesar disso, as células CD14+ não mantiveram a significância estatística na análise multivariada.

A “pega” do enxerto

Vários fatores influenciam a “pega” dos neutrófilos e das plaquetas, como por exemplo, a disparidade da tipagem do sistema HLA entre doador e receptor, a quantidade de células precursoras e dos linfócitos T do enxerto, a profilaxia para a GVHD, infecções virais, a doença veno oclusiva hepática (SCHMITZ, 1995).

Não encontramos nenhuma relação entre a “pega” dos neutrófilos e das plaquetas com a idade, o sexo do doador, o sexo do receptor e as células do enxerto e nem com o diagnóstico de doença maligna e não maligna.

A cinética de “pega” deve apresentar outros fatores além dos fatores demográficos dos receptores e doadores e das características do enxerto. Os precursores do enxerto do TMO sofrem um atraso na sua proliferação, causado pela presença de células estromais da MO, podendo também alterar a cinética dessas células progenitoras para a circulação (GORDON, 1997).

Sobrevida

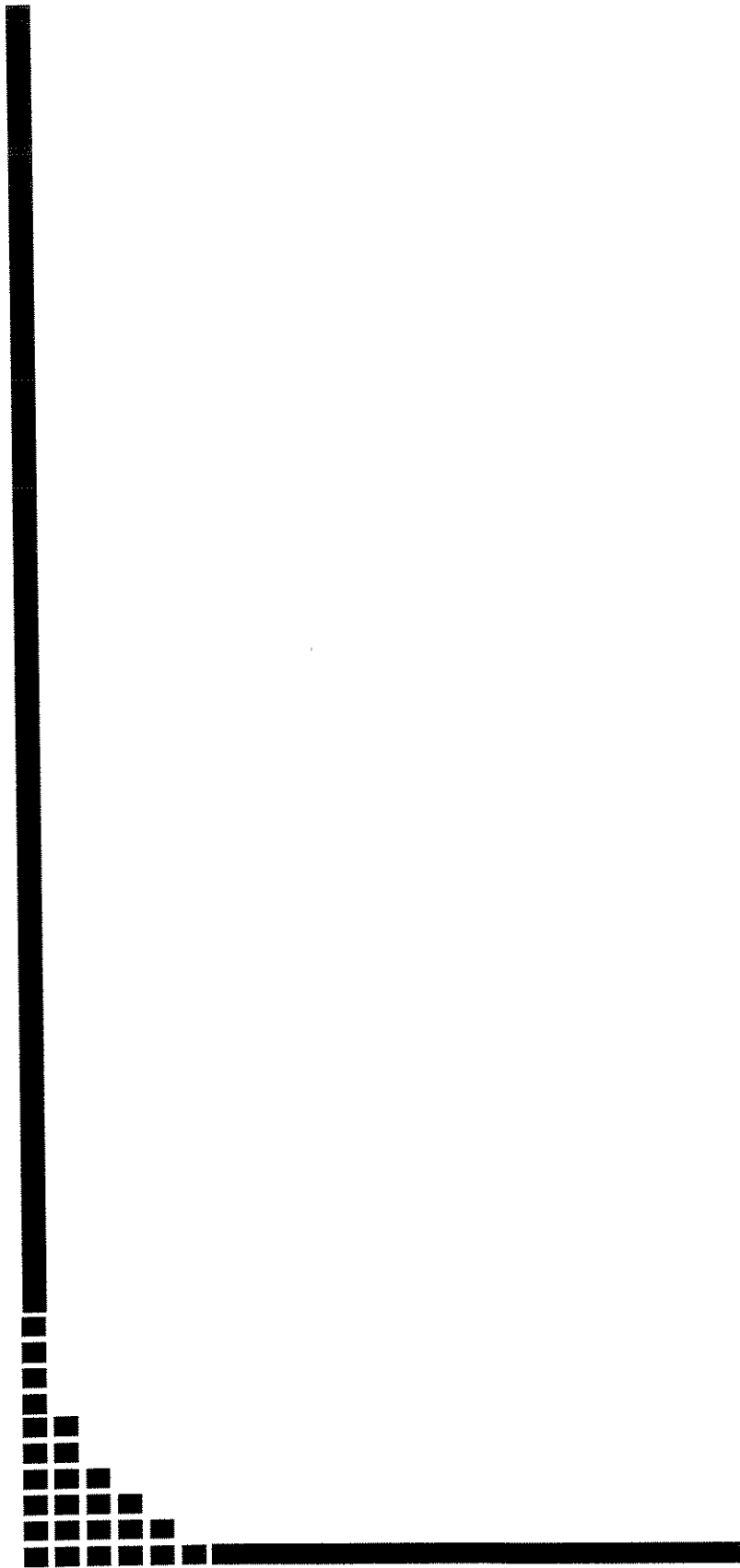
A sobrevida global dos nossos pacientes, estimada em 6 anos foi de 66%, com intervalo de confiança entre 55% - 79%. Esse dado está dentro do observado em trabalhos anteriores.

Na análise univariada, o único fator encontrado em relação à sobrevida foi a ausência da GVHD-A ($P<0,001$). Uma tendência de melhor sobrevida foi encontrado para os pacientes que receberam maior número de células CD34+ ($P=0,06$), como descrito por Morariu-Zamfir et al (2001).

Considerações finais

Nosso trabalho pode levar uma nova direção para a pesquisa clínica do TMO. Estudos prospectivos controlados são necessários para tentar-se uma melhor compreensão da relação do produto do enxerto, em especial os monócitos e a GVHD-A. Assim, pode-se tentar estabelecer metas novas de tratamento ou um outro fator prognóstico em relação ao procedimento.

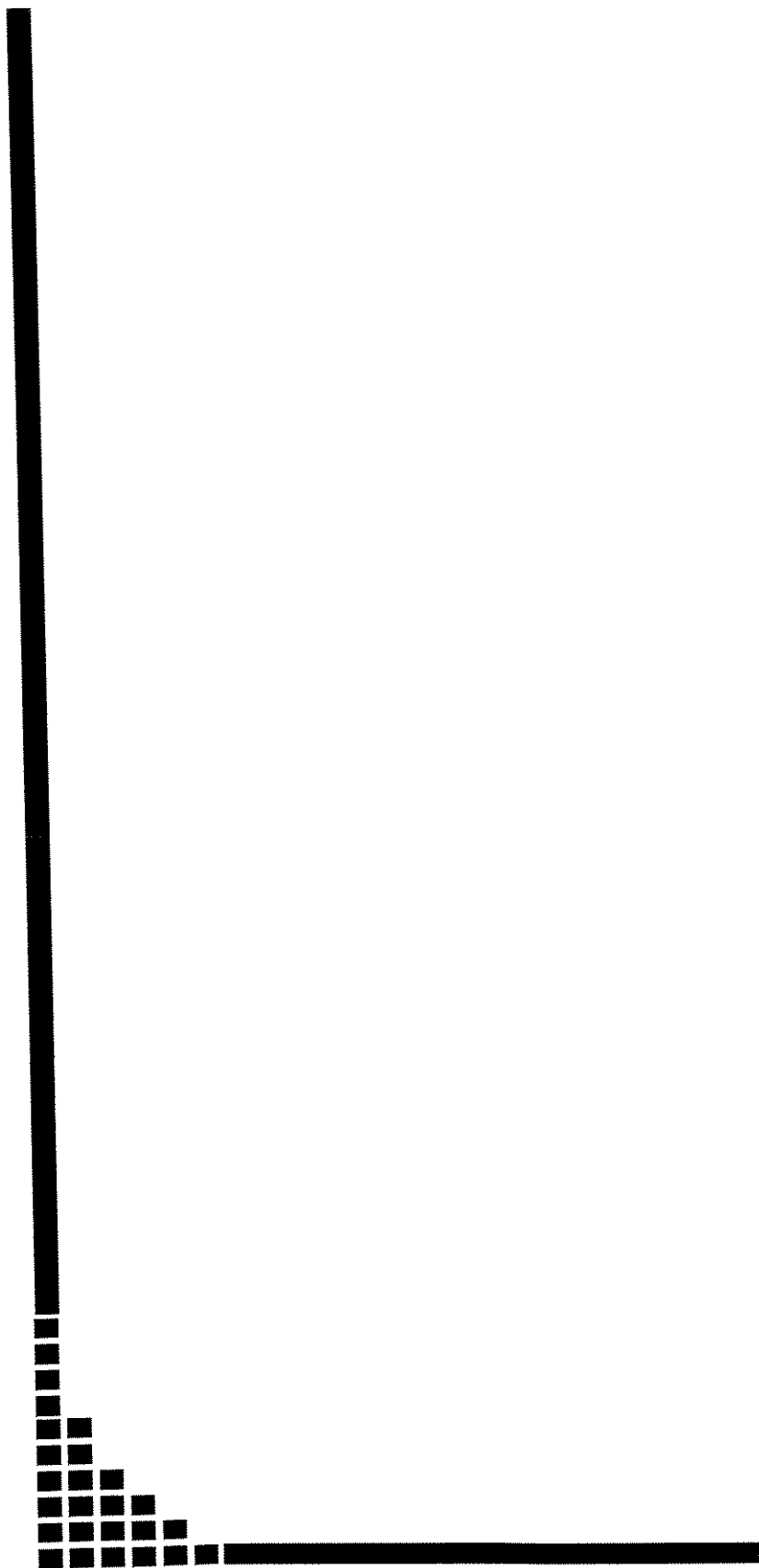
Acreditamos que esse estudo pode estimular, além de novos trabalhos clínicos, também estudos funcionais entre monócitos do enxerto e GVHD, na tentativa de conseguir responder com maior clareza às relações entre essas células acessórias e a fisiopatologia da GVHD e seus possíveis usos na prática clínica.



CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstrou:

- Os monócitos no TMO parecem exercer um efeito protetor contra a GVHD-A, quando a fonte de células progenitoras utilizada foi a medula óssea
- Os riscos para a presença da GVHD-A, da análise univariada, foram:
 - Idade do receptor maior que 27 anos.
 - O número das células nucleadas totais infundidas no enxerto menor que ponto de corte determinado.
 - O número de células CD14⁺ infundidas no enxerto menor que ponto de corte determinado.
 - Sexo doador versus sexo do receptor, principalmente:
 - Feminino —→ Masculino
 - Masculino —→ Feminino
- Um risco maior para ocorrência da GVHD-A, na análise multivariada, foi associado ao número das células nucleadas totais infundidas no enxerto menor que o ponto de corte e a idade do receptor maior que 27 anos. Um risco maior para ocorrência da GVHD-C foi associado à presença da GVHD-A.
- Os riscos para sobrevida global (análise de Cox)
 - A presença da GVHD-A.
 - O número das células CD34⁺ infundidas no enxerto (tendência).



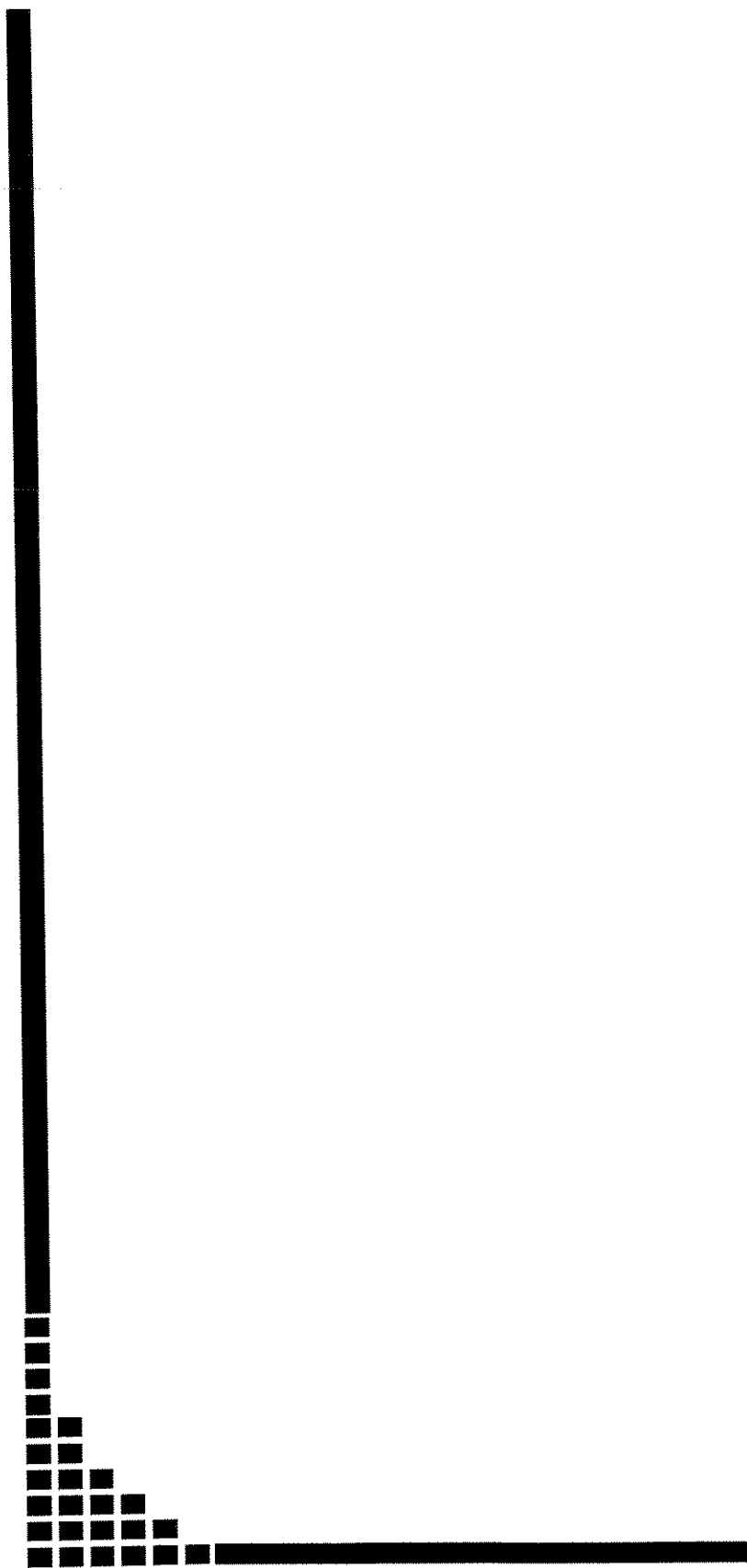
SUMMARY

The influence of graft monocytes on graft-versus-host disease (GVHD) has not yet been established in clinical trials. To further understand this association, we evaluated the influence of bone marrow graft monocytes aiming, primarily, to analyse the correlation with acute (a-GVHD) and chronic (c-GVHD), and secondarily, with engraftment and survival.

Eligibility criteria were: age <60 years; patients with primary malignant or non-malignant hematological disease receiving bone marrow from an HLA-identical sibling; availability of enumeration of CD34+ cells, T cells subsets, B cells and monocytes in the graft. We analyzed 83 patients. Conditioning was mainly BuCy2 and GVHD prophylaxis CSA-MTX.

The median day to reach peripheral neutrophils $\geq 0,5 \times 10^9/l$ and platelet count $>20 \times 10^9/l$ was 20 days (11-34) and 18,5 days (10-60) respectively. In univariate analysis, any parameter was correlated with a faster engraftment. The frequency of a-GVHD, grades 2-4 was 12/83 (14,5%). In univariate analysis, total nucleated cells (TNC) $\geq 2,31 \times 10^8/Kg$ and CD14+ cells $\geq 4,78 \times 10^6/Kg$ were correlated significantly with lower rates of a-GVHD ($p=0,04$, $p=0,02$, respectively). Furthermore, patients >27 years old and donor gender mismatch had higher rates of a-GVHD ($p=0,03$ and $p=0,04$, respectively). In a multivariate analysis, both TNC and age maintain significance for lower risk of a-GVHD. The probability was 3,2% when age <27 years and TNC infused $\leq 2,31 \times 10^8/Kg$. A higher risk of a-GVHD was found (51,5%) when age >27 years and TNC infused $\geq 2,31 \times 10^8/Kg$ ($p=0,01$). The number of CD14+ cells showed a correlation with TNC ($R=0,48$ Spearman correlation). Clinical c-GVHD of all grades developed in 31/77 (40%) available patients. There was a correlation between previous a-GVHD and higher risk of c-GVHD ($P<0,01$). There was a trend for a better survival in patients receiving more CD34+ cells ($p=0,06$). The CD14+ cells had no impact on overall survival.

These data suggest that monocytes may have a protective effect, reducing the frequency of acute graft-versus-host disease, in allogeneic BMT.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS AK, MURPHY KM, SHER A – Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature** 1996; 383: 789-93. acute graft-versus-host-disease. **Stem Cells** 1996 473-89.
2. AGEITOS AG, INO K, OZEROL I, TARANTOLO S, HEIMANN DG, TALMADGE JE.— Restoration of T and NK cell function in GM-CSF mobilized stem cell products from breast cancer patients by monocyte depletion. **Bone Marrow Transplant** 1997; 20: 117-23.
3. ALLEN RD, STALEY TA, SIDMAN CL – Differential cytokine expression acute and chronic murine graft-versus-host disease. **Eur J Immunol** 1993; 23: 333-.
4. ALTMAN DG. Pratical statistics for medical research. 1st edition London: Chapman & Hall, 1999: 417-8.
5. ANTIN JH, FERRARA JLM - Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. **Blood** 1992; 80: 2964-8.
6. ARAI S, VOGELSANG GB - Management of graft-versus-host disease. **Blood Reviews** 2000; 14: 190-204.
7. ATKINSON K, FARREL C, CHAPMAN G, DOWNS K, PENNY R, BIGGS J – Female marrow donors increase the risk of acute graft-versus-host disease: effect of donor age and parity and analysis of cell subpopulations in the donor marrow inoculum. **Br J Haematol** 1986; 63: 231-9.
8. ATKINSON K, HOROWITZ MM, GALE RP, van BEKKUM DW, GLUCKMAN E, GOOD RA, JACOBSEN N, KOLB HJ, RIMM AA, RINGDEN O. – Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. **Blood** 1990; 75: 2459-64.
9. BAKER MB, ALTMAN NH, PODACK ER, LEVY RB - The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic resistance to bone marrow transplantation in mice. **J Exp Med** 1996; 183:2645-56.

10. BAKER MB, PODACK ER, LEVY RB - Perforin- and Fas- mediated cytotoxic pathways are not required for allogeneic resistance to bone marrow grafts in mice. **Biol Blood Marrow Transplant** 1995; 1: 69-73.
11. BENSINGER W, MARTIN P , STORER B, CLIFT R, Forman SJ, NEGRIN R, KASHYAP A, FLOWERS ME, LILLEBY K, CHAUNCEY TR, STORB R, APPELBAUM FR – Transplantation of bone marrow as compared peripheral blood stem cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. **N Engl J Med** 2001; 344: 175-81.
12. BOSTRÖM L, RINGDÉN O, WAHREN B, ZWAAN F, NILSSON B - A European multicenter study of chronic graft-versus-host disease. The role of cytomegalovirus serology in recipients and donors – acute graft-versus-host disease after allogeneic and splenectomy. **Transplantation** 1990; 45: 1100-5.
13. BROSS DS, TUTSCHKA PJ, FARMER ER, BESCHORNER WE, Braine HG, Mellits ED, BIAS WB, SANTOS GW – Predictive factors for acute graft-versus-host disease in patients transplanted with HLA-identical bone marrow. **Blood** 1984; 63: 1265-70.
14. BUNDSCHUH DS, BARSIG J, HARTUNG T, RANDOW F, DOCKE WD, VOLK HD, WENDEL A. – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lypopolysaccharide-desensitized mice. **J Immunol** 1997; 158: 2862-71.
15. CARLENS S, RINGDÉN O, REMBERGER M, LÖNNQVIST B, HAGGLUND H, KLAESSON S, MATTSSON J, SVAHN BM, WINIARSKI J, LJUNGMAN P, ASCHAN J. – Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single center analysis. **Bone Marrow Transplant** 1998; 22: 755-61.
16. CAVET J, MIDDLETON PG, SEGALL M, NOREEN H, DAVIES SM, DICKINSON AM. Recipient tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphism associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. **Blood** (1999); 94:3941-6.

17. CUTLER C, GIRI S, JEYAPALAN S, PANIAGUA D, VISWANATHAN A, ANTIN JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. **J Clin Oncol** 2001; 19:3685-91.
18. DeL PRETE GF, DECARLI M, MASTROMAURO C, BIAGIOTTI R, MACCHIA D, FALAGIANI P, RICCI M, ROMAGNANI S. – Purified protein derivate of mycobacterium-tuberculosis and excretory-secretary antigen(s) of toxocara canis expand in vitro human T-cells with stable and opposite (Type-1 T-helper
19. DELVES PJ, ROITT IM – The immune sistem. **New Engl J Med** 2000;343: 37-49.
20. Ferrara JLM, Cooke KR, Pan L, Krenger W. – The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. **StemCell** 1996: 473-89.
21. FERRARA JLM, DEEG HJ - Mechanisms of disease. **N Engl J Med** 1991; 324: 667-73.
22. GALE RP, BORTIN MM, van BEKKUN, BIGGS JC – Risk factors for acute graft-versus-host disease. **Br J Haematol** 1987; 67: 397-406.
23. GLUCKSBERG H, STORB R, FEFER A, BUCKNER CD, NEIMAN PE, CLIFT RA, LERNER KG, THOMAS ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. **Transplantation** 1974 Oct;18(4):295-304
24. GORDON MY, LEWIS JL, MARLEY SB, GRAND FH, GOLDMAN JM – Stromal cells negatively regulate primitive haematopoetic progenitor cell activation via a phosphatidylinositol-anchored cell adesion/signalling system. **Br J Haematol** 1997; 96: 647-53.
25. HILL GR, FERRARA JLM - The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. **Blood** 2000; 95: 2754-9.

26. HOLLER E, RONCAROLO MG, HINTERMEIER-KNABE R, EISSNER G, ERTL B, SCHULZ U, KNABE H, KOLB HJ, ANDREESEN R, WILMANNNS W. -. Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. **Bone marrow transplant** (2000); 25:237-41.
27. HOLMES JÁ, LIVESEY SJ, BEDWELL AE, AMOS N, WHITTAKER JÁ. – Autoantibody analysis in chronic graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant** 1989; 4: 529-31.
28. HSIEH CS, HEIMBERGER AB, GOLD JS, O'GARRA AO, MURPHY KM. – Differential regulation of T helper phenotype development by interleukin 4 and 10 in an T-cell-receptor transgenic system. **PNAS USA** 1992; 89: 6065-69
29. HSIEH CS, MACATONIA SE, TRIPP CS, WOLF SF , O'GARRA A, MURPHY KM. – Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science** 1993; 260: 547-49.
30. INO K, SINGH RK, TALMADGE JE - Monocytes from mobilized stem cells inhibit T cell function. **J Leukocyte Biol** 1997; 61: 583 – 91.
31. ISOBE M, SUZUKI J, YAMAZAKI S, YAZAKI Y, HORIE S, OKUBO Y, MAEMURA K, YAZAKI Y, SEKIGUCHI M. – Regulation by differential development of Th1 and Th2 cells in peripheral tolerance to cardiac allograft induced by blocking ICAM-1/LFA-1 adhesion. **Circulation** 1997; 96: 2247-53.
32. KERNAN NA, COLLINS NH, JULIANO L, CARTAGENA T, DUPONT B, O'REILLY RJ. – Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-versus-host disease. **Blood** 1986; 68: 770-3.
33. KRENGER W, COOKE KR, CRAWFORD JM, SONIS ST, SIMMONS R, PAN L, DELMONTE J JR, KARANDIKAR M, FERRARA JL. – Transplantation of polarized type 2 donor T cells reduces mortality caused by experimental graft-versus-host disease. **Transplantation** 1996; 62: 1278-85.

34. KRENGER W, SNYDER KM, BYON CH, FALZARANO G, FERRARA JL – Polarized type 2 alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. **J Immunol** 1995; 155: 585-93.
35. LISTER J, MESSNER H, KEYSTONE E, MILLER R, FRITZLER MJ. – Autoantibodies analysis of patients with graft versus host disease. **J Clin Lab Immunol** 1987; 24: 19-23.
36. LOUGHRAN TP, SULLIVAN K, MORTON T, BECKHAM C, SCHUBERT M, WITHERSPOON R, SALE G, SANDERS J, FISHER L, SHULMAN H, et al. – Value of day 100 screening studies for predicting the development of chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **Blood** 1990; 76: 228-34.
37. MIELCARCK M, GRAF L, JOHNSON G, TOROK-STORB B – Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T-cell proliferation. **Blood** 1998; 92: 215-22.
38. MIELCAREK M, ROECKLEIN BA, TOROK-STORB B – CD14⁺ cells in granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood mononuclear cells induce secretion of interleukin-6 and G-CSF by marrow stroma. **Blood** 1996; 87: 574-80. MIELCAREK M, MARTIN PJ, TOROKO-STORB B – Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14⁺ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. **Blood** 1997; 89: 1629-34.
39. MORARIU-ZAMFIR R, ROCHA V, DEVERGIE A, SOCIÉ G, RIBAUD P, ESPEROU H, PARQUET N, GUARDIOLA P, DAL CORTIVO L, BITTENCOURT H, GARNIER F, TRAINEAU R, MAROLLEAU JP, CHEVRET S, GLUCKMAN E – Influence of CD34⁺ marrow cell dose on outcome of HLA-identical sibling allogeneic bone marrow transplants in patients with chronic myeloid leukaemia. **Bone Marrow Transplant** 2001; 27: 575-80.

40. MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. – Two types of murine T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol** 1986; 136: 2348-57.
41. MOSMANN TR, SAD S – The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol Today** 1996; 17: 138-46.
42. MOWAT AM – Antibodies to IFN-gamma prevent immunological mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reactions. **Immunology** 1989; 68: 18-23.
43. MUNN DH, PRESSEY J, BCALL AC, HUDES R, ALDERSON MR. – Selective activation-induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. **J Immunol** 1996; 156: 523-32.
44. MURPHY GF, WHITAKER D, SPRENT J, KORNGOLD R - Characterization of target injury of murine acute graft-versus-host disease directed to multiple minor histocompatibility antigens elicited by either CD4⁺ or CD8⁺ effector cells. **Am J Pathol** 1991; 138: 983-90.
45. MURPHY WJ, KOH CY, RAZIUDDIN A, BENNET M LONGO DL. - Immunobiology of natural killer cells and bone marrow transplantation: merging of basic and preclinical studies. **Immunol Rev** 2001; 181: 279-89.
46. MURPHY WJ, LONGO DL - The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **Immunol Rev** 1997; 181: 167-76.
47. NASH RA, PEPE MS, STORB R, LONGTON G, PETTINGER M, ANASETTI C, APPELBAUM FR, BOWDEN RA, DEEG HJ, DONEY K, et al.: Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. **Blood** 1992; 80: 1838-45.
48. NAWA Y, TESHIMA T, SUNAMI K, HIRAMATSU Y, YANO T, SHINAGAWA K, OMOTO E, HARADA M. - Response of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells to alloantigen stimulation. **Blood** 1997; 90: 1716-8.

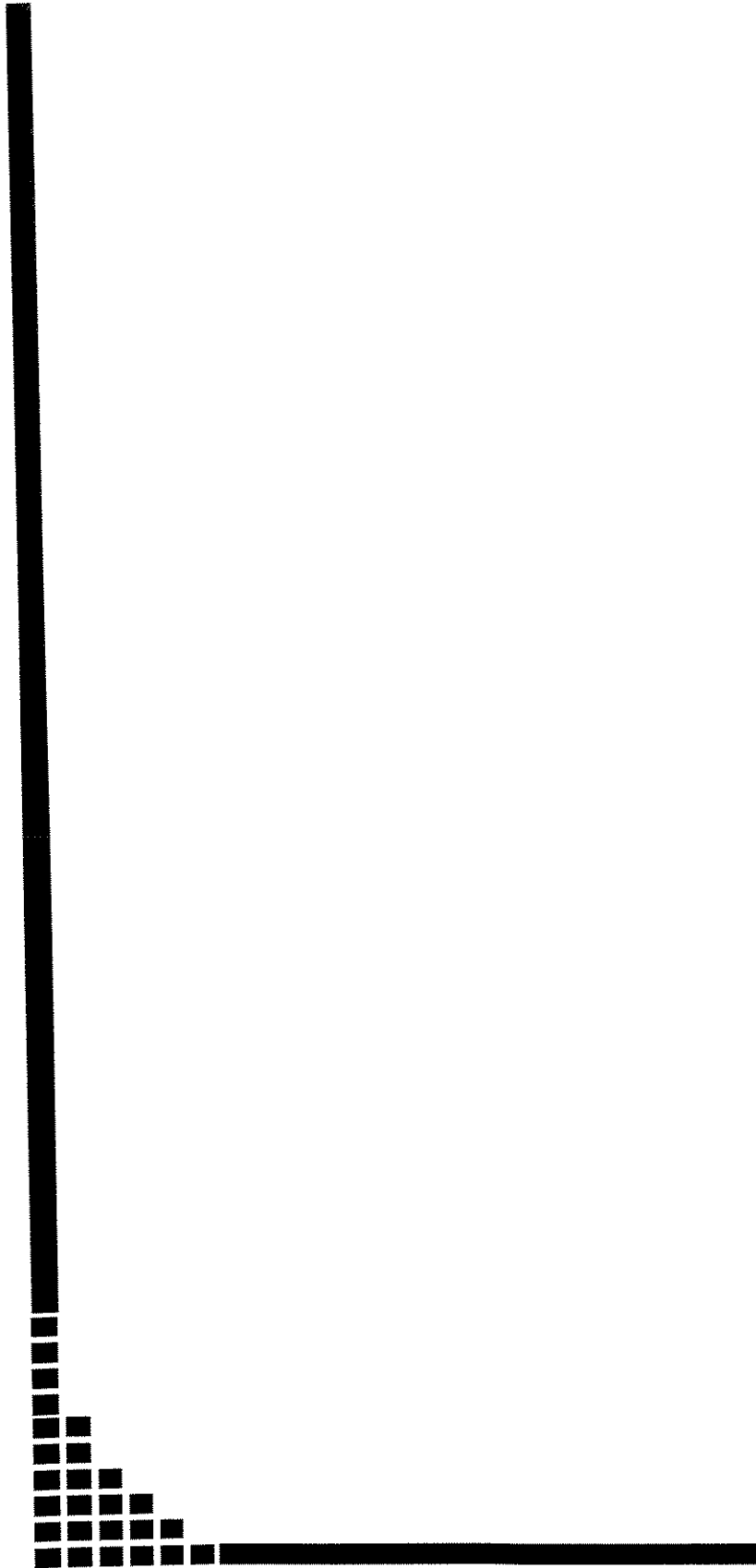
49. NIKOLIC B, LEE S, BRONSON RT, GRUSBY MJ, SYKES M. – Th1 and Th2 mediated acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest* 2000; 105: 1289-98.
50. or Type-2 T-helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991; 88: 346-50.
51. PAN L, DELMONTE J Jr, JALONEN CK, FERRARA JLM – Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of graft versus host disease. *Blood* 1995; 86: 4422-29.
52. PARKMAN R – Is chronic graft versus host disease an autoimmune disease? *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 800-3.
53. PERREAULT C, DECARY F, BROCHU S, GYGER M, BELANGER R, ROY D. – Minor histocompatibility antigens. *Blood* 1990; 76: 1269-80.
54. PERRY AR, LINCH DC – The history of bone-marrow transplantation. *Blood Reviews* 1996; 10: 215-9.
55. PRZEPIORKA D, SMITH TL, FOLLODER J, KHOURI I, UENO NT, MEHRA R, KORBLING M, HUH YO, GIRALT S, GAJEWSKI J, DONATO M, CLEARY K, CLAXTON D, BRAUNSCHEWIG I, van BESSEN K, ANDERSSON BS, ANDERLINI P, CHAMPLIN R. – Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* 1999; 94: 1465-70.
56. QUARANTA S, SHULMAN H, AHMED A, SHOENFELD Y, PETER J, McDONALD GB, Van de WATER J, COPPEL R, OSTLUND C, WORMAN HJ, RIZZETTO M, TSUNAYAMA K, NAKANUMA Y, ANSARI A, LOCATELLI F, PAGANIN S, ROSINA F, MANNS M, GERSHWIN ME. – Autoantibodies in human chronic graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. *Clin Immunol* 1999; 91: 106-16.

57. RATANATHARATHORN V, AYASH L, LAZARUS HM, FU J, UBERTI JP. – Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. **Bone Marrow Transplant** 2001; 28: 121-9.
58. RATANATHARATHORN V, NASH RA, PRZEPIORKA D, DEVINE SM, KLEIN JL, WEISDORF D, FAY JW, NADEMANEE A, ANTIN JH, CHRISTIANSEN NP, VAN DER JAGT R, HERZIG RH, LITZOW MR, WOLFF SN, LONGO WL, PETERSEN FB, KARANES C, AVALOS B, STORB R, BUELL DN, MAHER RM, FITZSIMMONS WE, WINGARD JR. – Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. **Blood** 1998; 92: 2303-14.
59. ROUQUETTE-GALLY AM, BOYELDIEU D, PROST AC, GLUCKMAN E – Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 53 long term surviving patients. **Transplantation** 1988; 46: 238-40.
60. SCHMITZ N, BEKSAC M, HASENCLEVER D, BACIGALUPO A, GORIN N, SZER J, ET AL. – A randomized study study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cells with bone marrow transplantation in 350 patients with leukemia. **Blood** 2000; 96(11) 2068 (abstract), Part 1.
61. SCHMITZ N, DREGER P, SUTTORP M, ROHMEDDER EB, HAERLACH T, LOFFLER H, HUNTER A, RUSSELL NH. – Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). **Blood** 1995; 85: 1666-72.
62. SHERER Y, SHOENFELD Y – Autoimmune diseases and auto-immunity post-bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant** 1998; 22: 873-81.
63. SHULMAN HM, SULLIVAN KM, WEIDEN PL et al.: Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. **AM J Med** 1980; 69: 204-17.

64. SOCIE G, STONE JV, WINGARD JR, WEISDORF D, HENSLEE-DOWNEY PJ, BREDESON C, CAHN JY, PASSWEG JR, ROWLINGS PA, SCHOUTEN HC, KOLB HJ, KLEIN JP. – Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. **New Engl J Med** 1999; 341: 14-21.
65. STORB R, DONEY KC, THOMAS ED, APPELBAUM F, BUCKNER CD, CLIFT RA, DEEG HJ, GOODELL BW, HACKMAN R, HANSEN JÁ, SANDERS J, SULLIVAN K, WEIDEN PL, WITHERSPOON RP. – Marrow transplantation with or without donor buffy coat cells for 65 transfused aplastic anemia patients. **Blood** 1982; 59: 236-46.
66. STORB R, PRENTICE RL, SULLIVAN KM, SHULMANN HM – Predictive factors in chronic graft-versus-host disease in patients with aplastic anemia treated by marrow transplantation from HLA-identical siblings. **Ann Intern Med** 1983; 98: 461-6.
67. SULLIVAN K, AGURA E, ANASETTI C, APPELBAUM F, BAGDER C, BEARMAN S, ERICKSON K, FLOWERS M, HANSEN J, LOUGHRAN T, et als.– Chronic graft versus host disease in other late complication of bone marrow transplantation. **Sem Hematol** 1991; 28: 250-9.
68. TANAKA J, IMAMURA M, KASAI M, ASAKA M, TOROK-STORB B - The role of accessory cells in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. **Int J Hematol** 1999; 69: 70-4.
69. TANAKA J, MIELCAREK M, TOROK-STORB B - Impaired induction of the CD28-responsive complex in granulocyte colony-stimulating factor mobilized CD4 T cells. **Blood** 1998; 91: 347-52.
70. TOWNSEND RM, BRIGGS C, MARINI JC, MURPHY GF, KORNGOLD R.: Inhibitory effect of a CD4-CDR3 peptide analog on graft-versus-host disease across a major histocompatibility complex-haploidentical barrier. **Blood** 1996; 88: 3038-47.

71. TRINCHIERI G – Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Annu Rev Immunol** 1998; 70: 83-243.
72. UENO Y, TAKANO N, KANEGANE H, YOKOI T, YACHIE A, MIYAWAKI T, TANIGUCHI N. – The acute phase nature of interleukin 6 studied in Kawasaki disease and other febrile illness. **Clin Exp Immunol** 1989; 76: 337-342.
73. VIGORITO AC, AZEVEDO WM, MARQUES JF, AZEVEDO AM, EID KA, ARANHA FJ, LORAND-METZE I, OLIVEIRA GB, CORREA ME, REIS AR, MIRANDA EC, DE SOUZA CA. – A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of hematologic malignancies. **Bone Marrow Transplant** 1998; 22: 1145-51.
74. VIGORITO AC, MARQUES JF, ARANHA FJP, OLIVEIRA GB, MARTINS MIRANDA EC, DE SOUZA CA. – A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of hematologic malignancies: an update. **Haematologica** 2001; 86: 665-6.
75. VOGELSANG GB – How I treat chronic graft-versus-host disease. **Blood** 2001; 97: 1196-1201.
76. WAGNER JL, SEIDEL K, BOECKH M, STORB R – De novo chronic graft-versus-host disease in marrow graft recipients given methotrexate and cyclosporine: risk factors and survival. **Biol Blood Marrow Transplant** 2000; 6: 633-9.
77. WEISDORF D, HAKKE R, BLAZAR B, MILLER W, MCGLAVE P, RAMSAY N, KERSEY J, FILIPOVICH A – Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. **Transplantation** 1991; 51: 1197-203.
78. WILLIAMS MA, KOUROMOUSSIS I, SYNDERCOMBE-COURT D, HENDRY L, HENDRY L, NEWLAND AC, KELSEY SM. – Administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rHuGM-CSF) after chemotherapy regulates the expression and secretion of monocyte TNF and TNF receptors p55 and p75. **Blood** 1995; 86: 4234-42.

79. WILLIAMS MA, NEWLAND AC, KELSEY SM – The potential for monocyte mediated immunotherapy during infection and malignancy. Part 1: Apoptosis induction and cytotoxic mechanisms. **Leuk Lymphoma** 1999; 34: 1-23.
80. WILLIAMS MA, RHOADES CJ, NEWLAND AC, KELSEY SM – The potential for monocyte mediated immunotherapy during infection and malignancy. Part 2: In vivo activation by exogenous cytokines and clinical application. **Leuk Lymphoma** 1999; 34: 207-30.
81. WINGARD JR, PIANTADOSI S, VOGELSANG GB, FARMER ER, JABS DA, LEVIN LS, BESCHORNER WE, CAHILL RA, MILLER DF, HARRISON D, et al. – Predictors of death from chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **Blood** 1989; 74: 1428-35.
82. Zaucha JM, Gooley T, Bensinger WI, HEIMFELD S, CHAUNCEY TR, ZAUCHA R, MARTIN PJ, FLOWERS ME, STOREK J, GEORGES G, STORB R, TOROK-STORB B. – CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. **Blood** 2001; 98:3221-7.



ANEXOS

N PAC	S	SD	DX	DTDX	IDADE	TMO	HOSP	P1	P2	REC	DTREC	OBITO	CAUSA
1	2.00	2.00	LLA	21/10/94	27.92	02/03/95	18.00	14.00	12.00	1.00	15/08/95	17/07/96	70.00
2	2.00	1.00	LMC	26/07/94	20.53	06/04/95	22.00	21.00	12.00	0.00	NA	NA	NA
3	1.00	1.00	LMC	04/04/94	56.86	27/04/95	36.00	34.00	42.00	0.00	NA	24/03/96	60.00
4	2.00	1.00	LLA	15/10/94	15.87	18/05/95	19.00	16.00	12.00	1.00	30/08/95	15/12/95	70.00
5	2.00	1.00	AA	28/12/94	3.55	08/06/95	28.00	22.00	20.00	1.00	NA	NA	NA
6	1.00	1.00	LMA	01/09/94	22.60	06/07/95	33.00	30.00	26.00	1.00	16/10/95	19/03/96	70.00
7	1.00	2.00	SMD	15/02/94	44.58	27/07/95	21.00	14.00	24.00	0.00	NA	09/09/95	50.00
8	1.00	2.00	LMC	27/07/94	56.94	10/08/95	21.00	16.00	13.00	0.00	NA	NA	NA
9	1.00	1.00	LMA	16/02/95	38.51	22/08/95	39.00	28.00	17.00	0.00	NA	NA	NA
10	1.00	1.00	LMA	03/06/95	32.35	04/01/96	25.00	20.00	22.00	0.00	NA	NA	NA
11	2.00	1.00	LMC	18/04/95	38.81	25/01/96	28.00	16.00	15.00	0.00	NA	NA	NA
12	1.00	1.00	LMC	24/04/95	43.00	04/04/96	21.00	15.00	10.00	0.00	NA	NA	NA
13	1.00	1.00	LLA	15/12/95	36.62	25/04/96	18.00	13.00	13.00	0.00	NA	NA	NA
14	1.00	1.00	LMC	14/03/95	35.70	23/05/96	26.00	20.00	14.00	1.00	21/10/98	NA	NA
15	1.00	2.00	LMC	19/01/95	48.53	20/06/96	33.00	22.00	19.00	0.00	NA	23/07/96	50.00
16	1.00	1.00	SMD	15/03/96	9.26	11/07/96	22.00	17.00	12.00	0.00	NA	NA	NA
17	2.00	2.00	AA	01/06/96	19.68	25/07/96	19.00	17.00	18.00	0.00	NA	NA	NA
18	2.00	2.00	LMC	15/06/93	31.27	15/08/96	47.00	22.00	35.00	0.00	NA	01/10/96	50.00
19	1.00	2.00	AA	15/02/96	10.03	23/08/96	38.00	28.00	38.00	1.00	15/03/98	16/08/00	22.00
20	2.00	2.00	LMC	01/06/95	29.95	05/09/96	29.00	28.00	18.00	0.00	NA	NA	NA
21	1.00	2.00	ABD	15/06/90	7.22	10/10/96	25.00	16.00	13.00	0.00	NA	NA	NA
22	1.00	2.00	AA	10/10/96	20.62	14/11/96	25.00	23.00	16.00	0.00	NA	NA	NA
23	1.00	2.00	LMC	15/11/93	27.26	21/11/96	49.00	28.00	40.00	0.00	NA	NA	NA
24	1.00	2.00	LMA	15/06/96	24.04	28/11/96	32.00	29.00	26.00	0.00	NA	NA	NA
25	1.00	2.00	SMD	30/07/96	36.87	16/01/97	20.00	17.00	13.00	0.00	NA	03/05/97	50.00
26	2.00	1.00	MM	15/10/90	48.30	30/01/97	42.00	13.00	19.00	0.00	NA	NA	NA
27	1.00	2.00	LMC	27/03/96	42.48	06/03/97	27.00	18.00	21.00	0.00	NA	26/06/97	60.00
28	1.00	1.00	AA	14/11/96	26.23	13/03/97	28.00	23.00	25.00	0.00	NA	27/05/97	50.00
29	1.00	1.00	LNH	22/02/94	27.07	03/04/97	19.00	13.00	16.00	0.00	NA	16/08/97	31.00
30	1.00	2.00	LMC	19/11/95	39.08	10/04/97	25.00	19.00	17.00	0.00	NA	NA	NA
31	1.00	2.00	MM	25/10/95	46.18	08/05/97	26.00	18.00	21.00	0.00	NA	23/12/97	21.00
32	1.00	1.00	LMA	06/10/95	15.73	28/05/97	18.00	15.00	16.00	0.00	NA	NA	NA
33	1.00	2.00	LMC	09/06/94	42.59	05/06/97	32.00	26.00	32.00	0.00	NA	NA	NA
34	1.00	1.00	LMC	09/12/91	54.41	03/07/97	NA	NA	NA	1.00	22/10/97	10/04/99	70.00
35	2.00	2.00	LMC	20/12/95	25.39	21/08/97	23.00	22.00	13.00	0.00	NA	NA	NA
36	1.00	2.00	AA	16/04/97	26.58	28/08/97	27.00	27.00	20.00	0.00	NA	NA	NA
37	1.00	2.00	Disentrio	19/07/96	3.39	11/09/97	38.00	30.00	60.00	1.00	07/04/98	NA	NA
38	1.00	2.00	LMC	24/01/96	34.58	13/11/97	36.00	19.00	16.00	0.00	NA	02/03/98	50.00
39	1.00	1.00	LMC	11/03/96	44.19	19/02/98	27.00	16.00	27.00	0.00	NA	17/02/00	21.00
40	1.00	2.00	AA	17/12/97	25.02	12/03/98	28.00	19.00	26.00	0.00	NA	06/02/99	NA
41	1.00	1.00	LLA	05/06/97	16.47	19/03/98	18.00	16.00	25.00	0.00	NA	NA	NA
42	1.00	1.00	LLA	04/04/96	20.70	02/04/98	20.00	14.00	16.00	0.00	NA	05/08/98	21.00
43	1.00	1.00	LLA	17/07/97	11.76	30/04/98	36.00	29.00	23.00	1.00	30/11/98	22/11/99	70.00
44	1.00	1.00	AA	18/07/96	16.42	19/09/96	24.00	17.00	14.00	1.00	22/09/98	NA	NA
45	2.00	1.00	LMC	05/08/97	41.69	04/06/98	23.00	21.00	18.00	0.00	NA	NA	NA
46	1.00	2.00	AA	03/03/98	7.27	25/06/98	32.00	29.00	28.00	0.00	NA	NA	NA
47	1.00	2.00	LMMC	23/07/97	17.18	16/07/98	32.00	31.00	41.00	1.00	23/11/98	12/01/99	50.00
48	2.00	2.00	LMC	14/04/97	38.01	24/07/98	32.00	29.00	38.00	0.00	NA	NA	NA
49	1.00	2.00	AA	09/12/97	27.81	30/07/98	26.00	23.00	12.00	1.00	05/04/99	NA	NA
50	1.00	2.00	LMC	03/11/97	21.06	13/08/98	30.00	29.00	24.00	1.00	02/02/99	20/06/99	70.00
51	2.00	1.00	LMC	15/03/97	43.89	03/09/98	44.00	19.00	20.00	0.00	NA	NA	NA
52	1.00	1.00	LMC	31/12/97	14.67	17/09/98	26.00	21.00	13.00	0.00	NA	NA	NA
53	2.00	2.00	AA	15/01/98	11.71	08/10/98	41.00	25.00	39.00	0.00	NA	NA	NA
54	1.00	1.00	AA	20/02/98	29.03	29/10/98	26.00	29.00	24.00	0.00	NA	NA	NA
55	2.00	2.00	LMC	29/01/97	18.00	12/11/98	34.00	18.00	15.00	0.00	NA	NA	NA
56	2.00	2.00	LMC	23/02/96	12.09	28/01/99	22.00	15.00	13.00	0.00	NA	NA	NA
57	1.00	1.00	LMC	25/09/97	48.19	18/02/99	24.00	20.00	22.00	0.00	NA	NA	NA
58	1.00	1.00	LMA	15/10/98	36.01	13/05/99	21.00	16.00	13.00	0.00	NA	NA	NA
59	1.00	2.00	LMC	08/02/98	24.20	20/05/99	19.00	13.00	18.00	0.00	NA	NA	NA
60	1.00	2.00	LMC	26/08/98	59.29	10/06/99	18.00	14.00	18.00	0.00	NA	NA	NA
61	1.00	2.00	LMC	14/11/97	27.54	24/06/99	31.00	29.00	16.00	0.00	NA	NA	NA
62	2.00	1.00	AA	15/07/91	31.96	05/08/99	14.00	12.00	14.00	0.00	NA	NA	NA
63	1.00	1.00	LMC	23/04/98	43.67	12/08/99	32.00	29.00	40.00	0.00	NA	NA	NA
64	2.00	1.00	AA	15/07/99	26.73	19/08/99	17.00	11.00	17.00	0.00	NA	06/12/99	31.00
65	1.00	1.00	LMC	07/06/98	21.88	26/08/99	31.00	16.00	18.00	0.00	NA	NA	NA
66	1.00	2.00	LMA	15/05/98	8.27	02/09/99	26.00	23.00	18.00	0.00	NA	NA	NA
67	1.00	1.00	LMC	16/09/98	13.78	09/09/99	20.00	19.00	12.00	0.00	NA	NA	NA
68	2.00	2.00	AA	08/09/99	12.08	07/10/99	21.00	20.00	27.00	0.00	NA	NA	NA
69	2.00	2.00	LMA	24/06/99	33.21	28/10/99	20.00	20.00	14.00	0.00	NA	NA	NA
70	1.00	1.00	LMC	15/03/99	34.20	11/11/99	25.00	17.00	18.00	0.00	NA	19/11/00	84.00
71	1.00	1.00	LMC	10/05/99	17.41	18/11/99	31.00	30.00	53.00	0.00	NA	NA	NA
72	1.00	2.00	LMC	15/03/95	32.58	25/11/99	32.00	24.00	23.00	0.00	NA	20/06/00	21.00
73	1.00	2.00	LMA	17/06/99	52.18	13/01/00	23.00	16.00	25.00	0.00	NA	NA	NA
74	2.00	2.00	LMC	15/02/99	24.30	20/01/00	20.00	17.00	20.00	0.00	NA	NA	NA
75	1.00	2.00	LMA	24/06/99	32.57	10/02/00	31.00	22.00	31.00	0.00	NA	NA	NA
76	1.00	1.00	LMC	28/05/99	29.52	23/03/00	20.00	20.00	15.00	0.00	NA	NA	NA
77	1.00	1.00	AA	08/02/99	25.19	05/05/00	19.00	19.00	13.00	0.00	NA	NA	NA
78	1.00	1.00	LMC	02/07/99	37.35	01/06/00	29.00	26.00	39.00	0.00	NA	NA	NA
79	1.00	2.00	AA	28/02/00	37.12	08/06/00	26.00	25.00	24.00	0.00	NA	01/10/00	21.00
80	1.00	1.00	LMA	19/05/00	20.18	05/10/00	19.00	15.00	25.00	0.00	NA	NA	NA
81	1.00	2.00	LMC	14/02/00	45.25	23/11/00	17.00	16.00	27.00	0.00	NA	NA	NA
82	1.00	1.00	LMC	14/11/99	23.38	30/11/00	18.00	17.00	12.00	0.00	NA	NA	NA
83	1.00	2.00	AA	28/11/00	12.04	28/12/00	29.00	29.00	28.00	0.00	NA	NA	NA

N PAC	GVA	DGVA	GVC	DGVC	SIT	SVIDATMO	SVIDADX	MNT	CNT	CD3	CD4	CD6	CD34	CD14	CD19
1	0.00	100.00	0.00	503.00	1	503.00	635.00	1.92	3.04	47.00	20.95	18.66	3.31	2.43	19.38
2	0.00	100.00	0.00	2278.00	0	2278.00	2296.00	1.49	3.09	26.37	10.99	13.43	17.55	8.69	70.36
3	0.00	100.00	2.00	101.00	1	332.00	720.00	1.42	2.37	47.70	27.80	15.10	10.96	6.60	14.40
4	0.00	100.00	0.00	211.00	1	211.00	426.00	1.46	4.35	170.05	75.99	86.59	29.36	8.51	179.22
5	0.00	100.00	0.00	2215.00	0	2215.00	2183.00	1.39	3.51	22.20	19.60	14.00	3.68	1.20	18.20
6	0.00	100.00	0.00	257.00	1	257.00	565.00	1.94	2.57	54.85	27.32	24.49	4.97	12.20	15.20
7	3.00	25.00	NA	NA	1	44.00	571.00	1.13	2.32	28.82	16.77	9.23	2.57	0.83	6.52
8	0.00	100.00	0.00	NA	0	2152.00	2122.00	1.67	1.96	75.15	42.97	26.63	9.46	0.40	18.80
9	0.00	100.00	1.00	101.00	0	1881.00	2068.00	1.39	3.34	54.87	20.14	22.51	5.15	5.68	18.70
10	0.00	100.00	1.00	404.00	0	1852.00	2067.00	1.29	2.64	35.98	21.52	14.62	1.87	0.76	10.64
11	2.00	90.00	2.00	712.00	0	1679.00	1961.00	1.10	2.91	101.02	51.29	46.08	2.75	6.63	22.64
12	0.00	100.00	1.00	211.00	0	1586.00	1932.00	0.93	2.51	65.54	36.37	26.85	1.37	6.26	22.30
13	0.00	100.00	1.00	278.00	0	1421.00	1553.00	0.94	2.56	78.14	41.23	34.11	8.11	2.68	16.10
14	0.00	100.00	1.00	188.00	0	1705.00	2141.00	1.29	3.23	29.94	23.12	9.90	17.43	6.78	49.40
15	4.00	21.00	NA	NA	1	33.00	551.00	1.24	2.87	94.48	51.57	42.60	9.82	4.87	43.60
16	0.00	100.00	1.00	706.00	0	1614.00	1732.00	0.73	1.77	71.46	21.47	26.61	10.25	16.53	53.69
17	0.00	100.00	1.00	425.00	0	1637.00	1691.00	1.16	2.96	30.93	23.12	13.51	13.10	1.40	16.93
18	4.00	29.00	NA	NA	1	47.00	1204.00	0.64	1.67	94.26	36.72	38.86	12.75	4.76	4.67
19	0.00	100.00	0.00	1644.00	1	1454.00	1644.00	0.83	2.17	116.23	37.25	44.37	18.17	17.04	21.42
20	0.00	100.00	1.00	138.00	0	1760.00	1958.00	1.02	2.97	87.83	49.92	37.87	5.64	3.12	9.40
21	0.00	100.00	1.00	369.00	0	1725.00	3867.00	0.98	2.53	100.96	40.00	41.39	10.40	8.85	14.60
22	0.00	100.00	2.00	222.00	0	1690.00	1499.00	1.07	3.11	126.28	49.08	66.00	11.62	7.42	15.75
23	0.00	100.00	2.00	349.00	0	1683.00	2584.00	0.73	1.55	76.17	32.55	31.62	3.05	0.71	16.20
24	0.00	100.00	1.00	628.00	0	1676.00	1535.00	0.70	1.54	99.33	57.96	44.72	6.92	4.96	11.01
25	4.00	34.00	0.00	277.00	1	107.00	277.00	0.66	2.10	68.00	35.80	35.00	17.50	3.03	19.00
26	0.00	100.00	0.00	1613.00	0	1613.00	3710.00	1.09	2.59	40.20	23.45	15.30	11.00	4.26	24.30
27	4.00	60.00	2.00	101.00	1	112.00	456.00	1.16	2.30	41.00	28.65	16.97	1.19	3.73	14.74
28	4.00	31.00	NA	NA	1	75.00	194.00	1.02	2.06	90.80	54.00	38.70	6.55	3.58	23.00
29	0.00	100.00	0.00	1271.00	1	135.00	1271.00	1.55	3.41	122.43	64.32	57.80	8.32	11.90	32.10
30	0.00	100.00	2.00	112.00	0	1543.00	1865.00	0.90	2.38	19.66	10.76	7.93	2.29	3.27	5.85
31	0.00	100.00	2.00	229.00	1	229.00	790.00	1.47	2.99	157.27	52.00	97.48	3.28	5.67	39.14
32	0.00	100.00	0.00	1495.00	0	1495.00	1606.00	0.66	2.23	107.00	52.40	41.60	5.23	7.43	50.10
33	0.00	100.00	1.00	530.00	0	1126.00	2218.00	0.93	1.75	61.14	33.90	26.09	2.69	0.68	14.85
34	0.00	100.00	0.00	646.00	1	646.00	2679.00	1.16	2.76	40.90	22.00	14.70	6.37	5.61	14.40
35	0.00	100.00	0.00	NA	0	1410.00	1814.00	0.97	2.38	96.70	44.80	51.90	7.94	4.80	34.10
36	0.00	100.00	0.00	NA	0	1403.00	1314.00	1.44	4.19	165.00	78.00	89.00	4.04	5.90	57.74
37	0.00	100.00	0.00	NA	0	1389.00	1607.00	1.20	3.04	97.10	50.90	47.40	5.35	11.40	79.60
38	4.00	86.00	NA	NA	1	109.00	768.00	0.45	1.46	44.38	18.37	25.15	7.11	1.93	55.43
39	0.00	100.00	2.00	218.00	1	728.00	1438.00	1.35	3.24	62.39	34.01	28.24	14.37	3.57	22.69
40	3.00	99.00	2.00	258.00	1	331.00	416.00	0.80	2.09	24.25	11.19	10.73	1.44	4.60	7.53
41	0.00	100.00	0.00	NA	0	882.00	1169.00	0.66	1.91	21.49	11.25	10.56	2.60	5.89	8.65
42	0.00	100.00	0.00	125.00	1	125.00	853.00	1.28	2.85	35.11	11.74	18.38	1.55	7.17	4.66
43	0.00	100.00	0.00	571.00	1	571.00	858.00	1.32	4.07	32.81	12.92	14.86	8.42	15.87	16.94
44	0.00	100.00	0.00	1746.00	0	1746.00	1615.00	0.94	2.25	72.52	22.48	38.96	5.65	5.55	24.48
45	0.00	100.00	0.00	1123.00	0	1123.00	1039.00	1.03	2.20	27.02	15.21	10.48	4.08	3.57	14.34
46	0.00	100.00	0.00	1102.00	0	1102.00	1059.00	0.96	2.48	25.64	10.99	12.04	10.73	14.49	22.35
47	0.00	100.00	0.00	180.00	1	180.00	538.00	0.73	2.03	33.02	19.30	13.49	2.76	8.75	5.94
48	0.00	100.00	2.00	349.00	0	844.00	1310.00	0.64	1.62	18.94	10.08	12.96	3.63	3.65	6.59
49	0.00	100.00	0.00	1067.00	0	1067.00	1137.00	1.22	2.73	34.86	14.80	19.64	4.16	6.11	10.61
50	0.00	100.00	0.00	311.00	1	311.00	594.00	1.04	2.54	33.97	14.95	15.43	2.26	4.47	10.43
51	2.00	26.00	2.00	230.00	0	1032.00	1368.00	1.02	2.23	27.23	14.94	11.35	1.93	5.46	4.55
52	0.00	100.00	2.00	287.00	0	1018.00	1066.00	1.06	4.62	23.30	10.17	9.88	4.92	27.07	16.04
53	0.00	100.00	0.00	997.00	0	997.00	1005.00	1.06	2.37	35.22	17.24	16.46	5.24	8.10	17.93
54	0.00	100.00	0.00	976.00	0	976.00	914.00	0.88	2.58	20.76	13.78	6.76	3.95	8.06	8.77
55	0.00	100.00	0.00	962.00	0	962.00	1314.00	0.66	1.88	19.03	10.56	8.60	2.92	4.73	11.89
56	0.00	100.00	2.00	139.00	0	885.00	1601.00	2.01	5.04	34.82	17.40	15.63	5.46	6.18	28.29
57	0.00	100.00	0.00	864.00	0	864.00	1201.00	1.26	2.57	31.84	18.05	14.09	3.70	6.09	5.91
58	0.00	100.00	0.00	780.00	0	780.00	750.00	1.53	3.07	32.32	14.74	16.10	4.26	2.55	18.14
59	0.00	100.00	0.00	598.00	0	598.00	1033.00	1.22	3.30	40.21	25.62	11.30	3.23	5.73	15.15
60	0.00	100.00	2.00	246.00	0	752.00	848.00	1.24	3.26	24.17	11.83	11.74	4.48	6.52	18.32
61	0.00	100.00	0.00	738.00	0	738.00	1021.00	1.19	2.93	29.76	14.97	15.54	3.03	4.35	24.53
62	3.00	69.00	0.00	696.00	0	696.00	3423.00	1.70	4.68	27.80	14.89	11.10	2.53	10.06	7.83
63	0.00	100.00	0.00	689.00	0	689.00	971.00	1.21	2.35	19.53	9.53	10.25	3.15	5.30	7.85
64	0.00	100.00	0.00	109.00	1	109.00	144.00	1.71	4.60	43.49	20.52	18.12	9.34	21.81	33.93
65	0.00	100.00	0.00	675.00	0	675.00	920.00	2.25	5.57	49.09	28.29	20.68	6.48	8.04	17.95
66	0.00	100.00	0.00	668.00	0	668.00	895.00	1.71	4.38	51.07	22.28	26.88	5.94	10.43	30.08
67	0.00	100.00	0.00	661.00	0	661.00	769.00	0.80	2.25	20.69	9.03	9.80	2.66	9.00	15.12
68	0.00	100.00	2.00	231.00	0	633.00	454.00	2.17	5.74	56.22	21.18	38.15	4.80	16.07	39.84
69	0.00	100.00	NA	NA	0	612.00	559.00	0.97	2.80	28.48	16.35	12.72	3.97	4.53	16.10
70	0.00	100.00	2.00	275.00	1	598.00	615.00	0.84	2.83	13.21	8.31	5.19	1.81	8.39	7.36
71	0.00	100.00	2.00	220.00	0	591.00	560.00	0.88	1.81	18.18	8.22	9.47	2.60	2.08	14.85
72	3.00	31.00	2.00	138.00	1	584.00	1924.00	0.66	1.85	16.80	8.04	8.13	1.21	3.15	5.97
73	0.00	100.00	0.00	535.00	0	535.00	538.00	0.73	1.96	24.54	13.73	11.84	2.79	4.83	5.87
74	0.00	100.00	2.00	158.00	0	528.00	638.00	0.91	1.97	37.75	12.14	24.84	2.08	4.58	7.10
75	0.00	100.00	2.00	162.00	0	507.00	545.00	1.90	5.25	60.45	30.70	30.01	4.17	9.06	26.48
76	0.00	100.00	0.00	465.00	0	465.00	553.00	1.87	4.51	30.96	14.37	14.98	4.81	9.01	7.97
77	0.00	100.00	0.00	422.00	0	422.00	689.00	1.31	3.34	40.76	19.47	9.53	3.93	2.39	22.60
78	0.00	100.00	0.00	395.00	0	395.00	529.00	1.37	2.96	28.65	17.31	11.32	3.78	9.85	6.90
79	0.00	100.00	0.00	388.00	1	388.00	216.00	1.48							

Subject: **manuscript 5493**

Date: Mon, 3 Dec 2001 16:48:55 +0100

From: **Igor Ebuli Poletti** <changes@haematologica.it>

To: **aranha@unicamp.br**

Dr. Francisco JP Aranha, M.D.

Bone Marrow Transplantation Unit

State University of Campinas

POB 6198

BR 13081-970 Campinas SP, Brazil

Dear Dr. Aranha:

Re: manuscript no. 5493

We are pleased to inform you that your revised paper entitled "The influence of the graft monocytes in the outcome of allogeneic bone marrow transplantation" has been provisionally accepted for publication in Issue 87, 02 (February 2002) as Scientific Letter.

Thank you very much for sending this interesting work to Haematologica.

Sincerely yours,

Prof. Mario Cazzola

Executive Editor

E-mail: mcazzola@haematologica.it

--

Igor Ebuli Poletti

Haematologica Journal Office

Strada Nuova 134

27100 Pavia, Italy

Scientific Letter

THE INFLUENCE OF THE GRAFT MONOCYTES IN THE OUTCOME OF ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION

Sir,

The influence of graft monocytes on graft-versus-host disease (GVHD) has not yet been established in clinical trials. To further understand this association, we evaluated the influence of bone marrow graft monocytes aiming, primarily, to analyse the correlation with acute (a-GVHD) and chronic GVHD (c-GVHD), and secondarily with engraftment and survival.

Allogeneic peripheral blood progenitor cells (PBPC) contain at least 10 times more T cells than bone marrow. Most studies have demonstrated that the incidence and severity of a-GVHD after allogeneic PBPC transplantation has not been higher than that observed after allogeneic bone marrow transplantation (BMT)^{1,2}. This may be due to a direct effect of G-CSF on T-cell function³ or the presence of cells that can suppress donor T cell responsiveness^{4,5,6}. The CD14⁺ monocytes in mobilized peripheral blood mononuclear cells (PBMC) suppress donor T cell proliferation in a dose-dependent fashion. Normal CD14⁺ cells, when used in comparable numbers, can also suppress T cell response, suggesting a similar functional state as those present in mobilized PBMC or normal bone marrow (BM)^{4,7}. However, recent studies suggest that both a-and c-GVHD are more frequent after PBPC transplants^{8,9}.

We analyzed retrospectively our data from the Bone Marrow Unit in the State University of Campinas. Eligibility criteria were: age <60 years; patients with primary malignant or non-malignant hematological disease receiving BM from an HLA-identical sibling; availability of enumeration of CD 34⁺ cells, T cell subsets, B cells and monocytes in the graft. All patients had at least 100 days of follow-up after transplantation, except those who died of GVHD before day 100. The analysis was based on July 1st, 2001.

The Kaplan-Meier method was used for estimating the probability of GVHD, and overall survival. Each outcome was evaluated using Cox proportional hazard regression models or logistic regression, and χ^2 test, when appropriated. Significance level was $p \leq 0.05$. S-Plus Software version 2000 was used. Cut-off values having simultaneously the best sensitivity and specificity for the variables analyzed were chosen according to the receiver operating characteristics curve (ROC) method. Patients were grouped according these values for analysis of acute and chronic GVHD.

We analyzed 83 patients. The patients, donors characteristics, and graft composition are shown on Table 1. The median day to reach peripheral leukocytes $\geq 0.5 \times 10^9/l$ and platelet count $> 20 \times 10^9/l$ was 20 (11-34) and 18.5 (10-60) respectively. In univariate analysis, any parameter was correlated with a faster engraftment.

The frequency of a-GVHD, grades 2-4 was 12/83 (14.5%). In univariate analysis, total nucleated cells (TNC) infused $\geq 2.31 \times 10^8/Kg$ and $CD14^+$ cells $\geq 4.78 \times 10^6/Kg$ were correlated significantly with lower rates of a-GVHD ($p=0.04$, $p=0.02$, respectively). Furthermore, patients > 27 years old and donor gender mismatch had higher rates of a-GVHD ($p=0.03$ and $p=0.04$, respectively) (Table 2). In a multivariate analysis, both TNC and age maintain significant for lower risk of a-GVHD. The probability was 3.2% when age < 27 years and TNC infused $\geq 2.31 \times 10^8/Kg$. A higher risk of a-GVHD was found (51.5%) when age > 27 years and TNC infused $\leq 2.31 \times 10^8/Kg$ ($P < 0.001$). The number of $CD14^+$ cells showed a correlation with TNC ($R=0.48$ Spearman correlation). This interaction might be the cause for the loss of significance for monocytes in the multivariate analysis. Clinical c-GVHD of all grades developed in 31/77 (40%) available patients. It was extensive in 20 cases and limited in 11 cases. In univariate analyses there was a correlation between previous a-GVHD and a higher risk of c-GVHD ($p < 0.001$) (Table 3). $CD14^+$ cells did not influence in c-GVHD.

The estimate of 6-year overall survival (OS) was 66% (95% CI: 55%-79%). In univariate analyses, the absence of a-GVHD was correlated with a higher survival ($p < 0.001$). Furthermore, there was a trend for a better survival in patients receiving more $CD34^+$ cells ($p=0.06$), as described by others¹⁰. The $CD14$ cells had no impact on overall survival.

These preliminary data suggest that CD14+ cells (monocytes) may have a protective effect in allogeneic BMT. Further controlled studies should be done in order to clarify this important point.

Francisco J P Aranha

Bone Marrow Transplantation Unit

Afonso C Vigorito

State University of Campinas, SP/Brazil

Cármino A De Souza

Bone Marrow Transplantation Unit

Gislaine B Oliveira

P.O. Box 6198 – Barão Geraldo

Roberto Zulli

Campinas – São Paulo - Brasil

Irene Lorand-Metze

1. Bensinger W, Martin P, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared peripheral blood stem cells from HLA- identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001; 344:175-81.
2. Vigorito AC, Comenalli Marques Jr JF, Penteado Aranha FJ, Oliveira GB, Martins Miranda EC, De Souza CA. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow transplantation in the treatment of hematologic malignancies: an update. *Haematologica* 2001; 86:665-6.
3. Pan L, Delmonte J Jr, Jalonon CK, Ferrara JL. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocyte toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft versus host disease. *Blood* 1995; 86:4422-9.
4. Mielcarek M, Martin PJ, Torok-Storb B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14+ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1997; 89:1629-34.
5. Ino K, Singh RK, Talmadge JE. Monocytes from mobilized stem cells inhibit T cell function. *J Leukocyte Biol* 1997; 61:583-91.

6. Tanaka J, Mielcarek M, Torok-Storb B. Impaired induction of the CD28-responsive complex in granulocyte colony-stimulating factor mobilized CD4 T cells. *Blood* 1998; 91:347-52.
7. Tanaka J, Imamura M, Kasai M, Asaka M, Torok-Storb B. The role of accessory cells in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Int J Hematol* 1998; 69:70-4.
8. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2001; 19:3685-91.
9. Schmitz N, Beksac M, Hasenclever D, Bacigalupo A, Gorin N, Szer J, et al. A randomised study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation comparing allogeneic transplantation of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cells with bone marrow transplantation in 350 patients with leukemia. *Blood* 2000; 96: (11) 2068, Part 1.
10. Morariu-Zamfir R, Rocha V, Devergie A, Socie G, Ribaud P, Esperou H, et al. Influence of CD34⁺ dose on outcome of HLA-identical sibling allogeneic bone marrow transplants in patients with chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:575-580.

Table 1: Features of the patients and donors, and composition of the graft (median and range).

Patients nr	83
Patients gender nr (%)	M=62 (75%)
	F=21 (25%)
Donors gender→Patients gender nr (%)	M→M=31 (37%)
	F→F=12 (15%)
	M→F= (37%)
	F→M=9(11%)
Disease	
CML nr (%)	39 (47%)
AA nr (%)	18 (22%)
AML nr (%)	11 (14%)
Others nr (%)	15 (17%)
Alive nr (%)	58 (70%)
Dead nr (%)	25 (30%)
Overall survival (days)	696 (33-2278)
TNC/Kg (10⁸)	2.64 (1.46-5.74)
TMNC/Kg(10⁸)	1.16 (0.45-2.25)
CD34/Kg(10⁶)	4.26 (0.57-29.36)
CD3/Kg(10⁶)	37.75 (13.21-170)
CD3/CD4/Kg(10⁶)	19.6 (8.04-78)
CD3/CD8/Kg(10⁶)	15.63 (5.19-97.48)
CD19/Kg(10⁶)	16.1 (3.36-179.2)
CD14/Kg(10⁶)	5.73 (0.4-49.86)
Abbreviations: (n ^o) number; M : male; F : female; CML : chronic myeloid leukaemia; AA : aplastic anaemia; AML : acute myeloid leukaemia, TNC : total nucleated cells; TMNC : total mononuclear cells	

Table 2: Univariate analyses examining the influence of the characteristics of the transplant and GVHD.

	ACUTE GVHD	CHRONIC GVHD
	(P) [OR (CI)]	(P) [OR (CI)]
Age	0.03 [0.26(0.07-0.93)]	0.13 [2.22(0.79-6.26)]
Patients gender	0.50 [1.59(0.43-5.93)]	0.52[1.45(0.46-4.53)]
Donors gender	0.26 [2.05(0.57-7.44)]	0.10[2.38(0.83-6.82)]
Donors gender mismatch	0.04 [6.83(1.40-33.45)]	0.45 [2.37(0.82-4.05)]
TNC	0.004 [0.15(0.04-0.58)]	0.84 [1.11(0.40-3.08)]
TMNC	0.26 [0.49(0.14-1.70)]	0.17 [0.48(0.17-1.39)]
CD34	0.26 [0.49(0.14-1.70)]	0.09 [0.42(0.14-1.18)]
CD3	0.30 [1.91(0.55-6.60)]	0.95 [0.97(0.35-2.67)]
CD4	0.90 [0.97(0.28-3.30)]	0.39 [0.64(0.3-1.78)]
CD8	0.39 [1.71(0.50-5.89)]	0.95 [0.97(0.35-2.67)]
CD19	0.19 [0.49(0.14-1.71)]	0.74 [0.84(0.30-2.32)]
CD14	0.02 [0.24(0.07-0.87)]	0.39 [0.64(0.23-2.32)]
Malignant X Non malignant	0.94[0.94(0.23-3.89)]	0.23 [2.21(0.57-8.50)]
Previous a-GVHD		0.008 [9.17(1.62-52)]
Abbreviations: OR: odds ratio; CI: confidence interval		