

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

**ASSOCIAÇÃO DA DOSE DE CÉLULAS CD34 COM  
RECUPERAÇÃO HEMATOPOÉTICA, INFECÇÕES E  
OUTROS DESFECHOS APÓS TRANSPLANTE  
ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA DE DOADOR  
FAMILIAR HLA-IDÊNTICO**

*Henrique Neves da Silva Bittencourt*

**Orientador:** Prof. Dr. Flávio Danni Fuchs

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

**ASSOCIAÇÃO DA DOSE DE CÉLULAS CD34 COM  
RECUPERAÇÃO HEMATOPOÉTICA, INFECÇÕES E  
OUTROS DESFECHOS APÓS TRANSPLANTE  
ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA DE DOADOR  
FAMILIAR HLA-IDÊNTICO**

*Henrique Neves da Silva Bittencourt*

**Orientador:** Prof. Dr. Flávio Danni Fuchs

*Tese de Doutorado apresentada no Curso de  
Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica pa-  
ra obtenção do título de Doutor em Medicina.*

Porto Alegre, 2002

## Ficha Catalográfica

B624a BITTENCOURT, Henrique Neves da Silva

Associação da dose de células CD34 com recuperação hematopoética, infecções e outras desfechos após transplante alogênico de medula óssea de doador familiar HLA-idêntico / Henrique Neves da Silva Bittencourt; orientação de Flávio Danni Fuchs. - Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Medicina, 2002.

134 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica. Porto Alegre, RS, 2002.

CDU: 616.71-018.46:616-089.84  
616.419-036.82:616-022.1  
616.018.4: 616.419-036.82: 616-089.84

### Descritores

Medula óssea: Transplante  
616.71-018.46:616-089.84

Sistema hematopoético : Recuperação : infecções  
616.419-036:616-022.1

Células progenitoras hematopoéticas : Transplante  
616-018.4:616.419-036:82:616-089.84

Bibliotecária responsável  
Iara Ferreira de Macedo, CRB – 10/430

*À minha esposa*

*Aos meus pais*

## **Agradecimentos**

---

Ao **Dr. Newton Neves da Silva**, meu avô, que vigia, desde o início, meus passos como cientista;

Ao **Prof. Dr. Flávio Danni Fuchs**, mais uma vez meu orientador, pela intervenção em momentos precisos, apoio contínuo e exemplo de pesquisador;

À **Prof. Dra. Eliane Gluckman**, pela oportunidade de realizar o trabalho, pelo apoio à minha estada em Paris e pelos valiosos conselhos, ensinamentos e orientações no campo profissional;

Ao **Dr. Vanderson Rocha**, exemplo único de profissional e de pessoa e amigo especial, sem o qual esta pesquisa não teria sido possível;

Aos **Drs. Agnés Devergie, Gérard Socié, Hélène Esperou e Patricia Ribaud**, médicos do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital Saint Louis, pelos ensinamentos transmitidos no dia-a-dia e pela contribuição a este estudo;

À **Profa. Dra. Lúcia Silla** e demais membros do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela alegria do convívio diário e pelo aprendizado contínuo.

## Sumário

---

### LISTA DE TABELAS

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 – BASE TEÓRICA</b> .....	12
<b>2.1 – Transplante de Medula Óssea Alogênico – Conceitos Básicos</b> .....	14
<b>2.2 – Complicações do Transplante</b> .....	20
<i>2.2.1 – Complicações Ligadas ao Condicionamento</i> .....	20
<i>2.2.2 – Doença do Enxerto contra o Hospedeiro</i> .....	22
<i>2.2.3 – Complicações Infecciosas</i> .....	25
2.2.3.1 – Infecções Bacterianas.....	27
2.2.3.2 – Infecções Fúngicas.....	28
2.2.3.3 – Infecções Virais.....	29
<b>2.3 – A Molécula CD34 e a Célula-Tronco Hematopoética</b> .....	31
<b>2.4 – Quantificações das Células Progenitoras Hematopoéticas Pre-         sentes no Enxerto e seu Impacto no desfecho dos Transplantes</b> .....	33
<b>3 – HIPÓTESE DE TRABALHO</b> .....	45
<b>4 – BIBLIOGRAFIA</b> .....	48
<b>5 – ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS</b>	
Association of CD34 Cell Dose with Hematopoietic Recovery, Infections and Other Outcomes after HLA Identical Sibling Bone Marrow Transplant.....	65
<b>6 – ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS</b>	
Associação da Dose de Células CD34 com Recuperação Hematopoética, In- fecções e Outros Desfechos após Transplante Alogênico de Medula Óssea de Doador Familiar HLA-Idêntico.....	101

## Lista de Tabelas

---

**Tabela 1** - Graduação da doença do enxerto contra o hospedeiro ..... 24

**Tabela 2** - Fatores que influenciam a mortalidade relacionada ao transplante e à  
recidiva após transplante de células-tronco hematopoéticas ..... 34

## **1 – INTRODUÇÃO**

---



## 1 - INTRODUÇÃO

---

O transplante de medula óssea (ou transplante de células progenitoras hematopoéticas) alogênico tem sido realizado no tratamento de diversas patologias hematológicas benignas e malignas (aplasia medular e leucemia mielóide crônica, por exemplo), além de doenças metabólicas e imunológicas congênitas (Armitage, 1994). A medula óssea foi a primeira fonte de células progenitoras hematopoéticas e permanece, até hoje, como a principal nos transplantes alogênicos, embora o uso de células progenitoras sangüíneas (sangue periférico ou de cordão umbilical) venha aumentando (Gluckman, 1997; Rindgen, 1999; Gratwohl, 1999).

Cerca de 30% dos pacientes têm um familiar HLA-compatível que poderá servir como doador de células progenitoras hematopoéticas para o transplante. Para os demais, a fonte de células poderá ser um doador não-relacionado (existem cerca de 7 milhões inscritos em todo o mundo) ou uma unidade de sangue do cordão umbilical.

Fatores vinculados ao paciente, à doença e ao diagnóstico, como idade, *status* da doença e tipo de doador influenciam de maneira significativa os diferentes desfechos após transplante de medula óssea alogênico (mortalidade relacionada ao transplante, recidiva e sobrevida global). O número de células infundidas sempre foi considerado um fator prognóstico importante relacionado à pega do transplante; doses baixas infundidas associavam-se a taxa de rejeição maior e a recuperação leucocitária mais lenta (Storb, 1977; Niederwieser, 1987). Mais recentemente, demonstrou-se que o número total de células nucleadas infundidas era um fator prognóstico importante para os demais desfechos do transplante alogênico:

doses baixas têm sido correlacionadas com aumento na mortalidade associada ao transplante (Mehta, 1997b; Sierra, 1997; Sierra, 2000) e redução na sobrevida livre de doença (Mehta, 1997b; Sierra, 1997; Sierra, 2000; Barrett, 2000). Essa afirmativa é válida independentemente da fonte de células progenitoras hematopoéticas (medula óssea, sangue periférico ou de cordão umbilical) ou da natureza do doador (aparentado ou não-aparentado) (Gluckman, 1997; Russell, 1999).

CD34 é a denominação de uma molécula de membrana presente em células progenitoras hematopoéticas e tem sido utilizada como um marcador dessas células, principalmente em transplante de células progenitoras periféricas (Korbling, 1995; Kiss, 1997; Weaver, 1997; Schulman, 1999). Mais recentemente, sua quantificação tem mostrado ser um importante fator prognóstico em transplante de medula óssea T- depletada ou proveniente de doador não-relacionado: o uso de doses elevadas de células CD34 positivas associou-se a melhor sobrevida global e a menor mortalidade relacionada ao transplante, além de haver evidências de uma taxa de recidiva menor (Mavroudis, 1996; Anasetti, 1999; Bahçeci, 2000). Ainda não se tem clareza sobre os mecanismos pelos quais a dose celular influencia esses desfechos. O estudo de Mavroudis, publicado em 1996, levantava possíveis respostas para tais achados: doses baixas de células CD34 infundidas estariam relacionadas a uma recuperação hematológica mais lenta e este fato talvez se refletisse na incidência de infecções (Mavroudis, 1996). Contudo o pequeno número de pacientes e a utilização de medula óssea depletada em linfócitos T não permitiam conclusões definitivas.

O objetivo principal deste estudo foi verificar a correlação entre a dose de células CD34 positivas e a recuperação hematopoética de maneira geral (a curto e longo prazos), a incidência de infecções após o transplante, a mortalidade relacionada ao procedimento e a sobrevida global. Para isso, foram coletados dados de uma coorte de 212 pacientes consecutivos submetidos a transplante de medula óssea não manipulada proveniente de doador familiar HLA-compatível.

## **2 – BASE TEÓRICA**

---

## 2 - BASE TEÓRICA

---

O transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas consiste na infusão dessas células provenientes de um doador (aparentado ou não-aparentado) em um paciente submetido previamente a quimioterapia ou radioterapia, usualmente mieloablativa. Esta modalidade de transplante vem sendo utilizada há mais de 30 anos para tratar diferentes tipos de doenças hematológicas malignas ou não (leucemias agudas e crônicas, linfomas, aplasia medular severa, etc.). Também tem servido para corrigir diversas doenças congênitas, como déficits imunológicos e doenças de depósito (imunodeficiência severa combinada e doença de Hunter, por exemplo) (Armitage, 1994). No ano de 1999, foram realizados, na Europa, 5.879 transplantes alogênicos, dos quais cerca de 60% utilizaram um doador familiar HLA- idêntico (European Group for Blood and Marrow transplantation – EBMT, 2001). Calcula-se que, nos Estados Unidos, realize-se anualmente um número semelhante de procedimentos.

O primeiro transplante de medula óssea com pega prolongada foi efetuado em 1963 por Mathé e colaboradores em um paciente com leucemia aguda refratária, o qual veio a falecer cerca de 20 meses após o procedimento em decorrência de um quadro hoje conhecido como doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (Mathé, 1963). Não se sabia, à época, se o paciente e seu doador eram HLA-compatíveis, pois o conhecimento da importância do sistema de histocompatibilidade ainda estava se construindo. Em 1968, Gatti e co-

laboradores descreveram o primeiro transplante de medula óssea com sucesso, em paciente portador de imunodeficiência severa combinada, a partir de um doador que se presumia ser HLA-compatível. Posteriormente verificou-se que existia uma diferença em um dos antígenos. O sucesso dessa e de outras iniciativas semelhantes levou o grupo de Seattle a desenvolver, em 1969, um programa de transplante de medula óssea em pacientes com leucemia aguda refratária ou aplasia de medula óssea, dando início à maior série de casos de transplante existente no mundo (Thomas, 1999).

Durante mais de 20 anos, a medula óssea foi a única fonte disponível de células progenitoras hematopoéticas e até hoje se emprega o termo transplante de medula óssea como sinônimo de transplante de células progenitoras hematopoéticas. Outras fontes dessas células são utilizadas hoje em dia, substituindo em várias situações a medula óssea. Em 1985, Juttner e colaboradores descreveram o primeiro transplante com células progenitoras hematopoéticas obtidas do sangue periférico através de citaférese e posterior congelamento (Juttner, 1985). Três anos depois, Gluckman e colaboradores realizaram o primeiro transplante com sangue de cordão umbilical (Gluckman, 1989). A década de noventa foi marcada pela disseminação dessas novas fontes. As células-tronco hematopoéticas originárias do sangue periférico são coletadas por meio de citaférese após sua mobilização por fatores de crescimento hematopoéticos (normalmente G-CSF) e vêm sendo utilizadas de maneira crescente como fonte de células, principalmente para a realização de transplantes autólogos. O transplante com células-tronco periféricas caracteriza-se, via de regra, por uma recuperação hematológica mais rápida em relação ao feito a partir de células obtidas da medula óssea. Por outro lado, no tocante ao uso destas células no transplante alogênico, ainda existem sérias dúvidas quanto a um risco mais elevado de DECH crônica (Storek, 1997; Schmitz, 1998; Hagglund, 1998; Russell, 1999). O transplante efetuado a partir de células do cordão umbilical apresenta um risco menor da doença, porém a recuperação hematopoética (pega) é mais lenta. Em 1997, cerca de dois terços dos transplantes alogênicos reportados ao *International Bone Marrow Transplantation Registry* (IBMTR) utilizavam como fonte de célu-

las progenitoras hematopoéticas a medula óssea, pouco menos de um terço usavam células-tronco periféricas e 2% empregavam sangue de cordão umbilical ( IBMTR, 2002 )

## **2.1 - Transplante de Medula Óssea Alogênico – Conceitos Básicos**

O transplante de medula óssea alogênico pode ser dividido em três fases distintas:

### **1ª fase - Condicionamento**

Classicamente, a realização de transplante de medula alogênico necessita da realização prévia de quimioterapia, associada ou não a radioterapia, com o intuito de eliminar a doença que motivou o transplante, “abrir espaço” para o enxerto a ser transplantado (mieloablação) e induzir uma imunossupressão suficientemente intensa para impedir que linfócitos remanescentes do receptor rejeitem o enxerto, processo conhecido como condicionamento.

A combinação de radioterapia de corpo inteiro com ciclofosfamida foi utilizada inicialmente no condicionamento de pacientes com leucemias agudas, com boa resposta (Thomas, 1975), e permanece sendo empregada. Um esquema de condicionamento usando somente quimioterápicos foi descrito por Santos e colaboradores em 1983 (Santos, 1983) e mostrou-se tão efetivo quanto o que associou rádio e quimioterapia, resultando na ampliação do número de instituições que poderiam realizar o procedimento por dispensar o acesso a um serviço de radioterapia (Clift, 1994). Atualmente existe uma série de esquemas de condicionamento, com combinações variadas de quimioterápicos e maneiras diferentes de realizar a irradiação de corpo total. O uso de anticorpos (mono ou policlonais, como linfoglobulina ou *campath*) associado ao condicionamento aumenta a imunossupressão a que o paciente é submetido e é especialmente recomendado para o condicionamento de portadores de aplasia medular e nos que receberão o enxerto de doador não-relacionado ou com alguma diferença HLA, como no caso de doador haplo-idêntico (Hongeng, 1997; Aversa, 1998).

O conceito de condicionamento mieloablativo como única maneira de se obter a pega e assegurar a manutenção do enxerto (células-tronco hematopoética) no receptor sofreu uma revisão nos últimos anos, fruto de uma nova abordagem denominada transplante com condicionamento não-mieloablativo – também conhecido como “minitransplante”. Na década de 80, Slavin e colaboradores haviam mostrado que recidivas após transplante de medula óssea alogênico algumas vezes eram tratadas com sucesso com a infusão de linfócitos provenientes do doador (Slavin, 1988). Esse chamado efeito enxerto contra leucemia parecia ter um papel importante, senão fundamental, na erradicação da doença de pacientes com hemopatias malignas. O condicionamento como agente único na erradicação da doença é página virada nos transplantes alogênicos. Em meados da década de 90, Storb e colaboradores, em Seattle, demonstraram que baixas doses de radioterapia de corpo inteiro eram suficientes para se obter a pega de medula óssea em cães (Yu, 1995). Utilizando todos estes conceitos, Giralt e colaboradores publicam, em 1997, os primeiros resultados com o uso de condicionamento não-mieloablativo (basicamente a associação de um análogo das purinas com citarabina ou melfalano) em pacientes com leucemia mielóide aguda e mielodisplasias. Dos 15 pacientes tratados, 8 obtiveram remissão completa e 6 destes tinham mais de 90% de células do doador no momento da análise, provando a viabilidade da abordagem (Giralt, 1997). Atualmente, diversos grupos testam essa nova modalidade para o tratamento de diferentes doenças (malignas ou benignas). A toxicidade do condicionamento mieloablativo (vide detalhes na seção Complicações do Transplante) impede sua realização em pacientes com mais de 55 anos ou com doenças associadas, fazendo com que o transplante com condicionamento não-mieloablativo seja uma alternativa para pacientes acima dessa idade.

### **2ª fase – Obtenção e infusão das células progenitoras hematopoéticas**

As células progenitoras hematopoéticas podem ser obtidas da medula óssea, do sangue periférico ou do sangue de cordão umbilical.

A coleta de medula óssea de um doador é um procedimento simples: o doador é anestesiado e colocado em decúbito ventral, e a medula é aspirada através de múltiplas punções das cristas ilíacas posteriores. O total de medula a ser coletado é calculado tendo por base o peso do paciente. Separam-se amostras para a determinação da concentração de células nucleadas por mililitros. O mínimo recomendável é de  $2 \times 10^8$  células nucleadas por quilograma. Após a coleta, a medula óssea é filtrada para a retirada de eventuais espículas ósseas. Se houver incompatibilidade ABO maior (por exemplo, se o doador possuir grupo sanguíneo A, e o receptor, O) a medula ainda passa por um processo de deseritrocitação. Em determinadas situações, como em alguns transplantes com doador não-relacionado e nos transplantes chamados haplo-idênticos, pode-se retirar uma parte dos linfócitos contidos no enxerto, para reduzir o risco da DECH, processo chamado de depleção T (Aversa, 1998).

Quando se utilizam células progenitoras provenientes do sangue periférico, faz-se necessário um processo denominado mobilização. Ele consiste na utilização de um fator de crescimento hematopoético, usualmente filgrastima ou lenograstima, por via subcutânea, com o intuito de levar para a circulação as células progenitoras hematopoéticas presentes na medula. Uma descrição mais detalhada do procedimento pode ser encontrada num artigo de Vigorito e colaboradores (Vigorito, 1998). Essas células são caracterizadas imunofenotipicamente pela presença de uma molécula na sua superfície, chamada de CD34. Para transplante alogênico recomenda-se um mínimo de  $2,5 \times 10^6$  células CD34 positivas (Beelen, 1997). Normalmente todo o processo dura 5 ou 6 dias. O uso de fatores hematopoéticos em doador sadio ainda é controverso. Embora a curto prazo não haja complicações, existem ainda dúvidas sobre potenciais efeitos adversos a longo prazo, pois o acompanhamento dos doadores ainda é insuficiente (Anderlini, 1997).



A realização com sucesso do primeiro transplante utilizando sangue de cordão umbilical, feito em Paris no ano de 1988, abriu caminho para a utilização em larga escala dessa fonte de células progenitoras hematopoéticas (Gluckman, 1989). A coleta do sangue de cordão é feita na fase final do parto ou, com mais freqüência, imediatamente depois da retirada da placenta, após o nascimento de uma criança a termo normal. Procura-se extrair a quantidade máxima de sangue possível, pois isso refletirá a quantidade de células presentes na unidade, um dos fatores decisivos no sucesso deste tipo de modalidade terapêutica. Efetuada a coleta, uma pequena alíquota do sangue de cordão é reversada para a realização da tipagem HLA e contagem dos diferentes parâmetros de estimativa do conteúdo de células progenitoras (isto é, número de células nucleadas, células CD34 e cultura de progenitores). O sangue é congelado em nitrogênio líquido para poder ser armazenado por um longo período. No caso de o transplante ser aparentado, o material, após testado para confirmação da compatibilidade, é descongelado para ser transplantado. No caso de transplante não-aparentado, constatada compatibilidade aceitável, a unidade é transportada para o centro transplantador onde será descongelada e utilizada.

Independentemente da fonte de células progenitoras hematopoéticas, o processo de transfusão (ou “transplante”) é simples. As células são infundidas em uma via central (cateter) através de um equipo sem filtro. O material é infundido durante aproximadamente uma hora (dependendo do volume). As reações são relativamente infreqüentes. No caso de incompatibilidade ABO, pode haver uma reação de hemólise mesmo quando se retira a maior parte das hemácias contidas no enxerto.

### **3ª fase – A pega do enxerto e a recuperação hematopoética**

Um dos objetivos do transplante de células progenitoras hematopoéticas é a reconstituição de uma hematopoese normal. Define-se normalmente a pega do enxerto como a obtenção de um número de neutrófilos superior a  $500/\text{mm}^3$  por pelo menos 3 dias. Sendo-se mais rigoroso nesta definição, deve-se evidenciar também que as células que “pegaram”

são originárias do enxerto. A chamada reconstituição autóloga, embora rara, é fenômeno que pode ocorrer.

A velocidade de pega varia de acordo com a fonte de células progenitoras. Quando se utiliza medula óssea como enxerto, a mediana de pega dos neutrófilos varia entre 16,5 e 26 dias no transplante aparentado e entre 20 e 30 dias no transplante não-aparentado (Pavletic, 1997; Schmitz, 1998; Hansen, 1998; Russell, 1999; Ringden, 1999; Powles, 2000). A pega é mais rápida quando se usam células progenitoras hematopoéticas provenientes do sangue periférico: 11 a 17,5 dias nos transplantes aparentados e 16 a 17 nos não-aparentados (Pavletic, 1997; Beelen, 1997; Schmitz, 1998; Russell, 1999; Ringden, 1999; Powles 2000). O sangue de cordão umbilical é o que apresenta a menor velocidade de pega, com mediana que oscila de 26 a 27 dias nos transplantes aparentados e de 27 a 33 nos não-aparentados (Locatelli, 1999; Thomson, 2000; Rocha, 2000).

Rejeição do enxerto é evento raro nos transplantes aparentados que empregam medula óssea ou sangue periférico. É mais freqüente nos não-aparentados, principalmente quando se depleta o enxerto de seus linfócitos T, e nos que utilizam sangue de cordão umbilical. O mecanismo de rejeição é mediado, de um lado, pela persistência de linfócitos do receptor e, de outro, pelos linfócitos contidos no enxerto, principalmente os linfócitos T CD8 positivos. Estes últimos, reconhecendo os linfócitos T remanescentes do doador, exercem sobre eles um mecanismo de “veto” que os inativa ou elimina (Martin, 1996). A maior incidência de rejeição nos transplantes não-aparentados depletados em linfócitos T é então explicada pela ausência (ou diminuição) desse mecanismo. A maior taxa de rejeição nos transplantes com sangue de cordão umbilical é explicada pela menor quantidade de células no enxerto (discutido em mais detalhes a seguir) e pela disparidade HLA presente na maioria dos transplantes não-aparentados (Gluckman, 1997).

A recuperação de contagens de plaquetas acima de  $20.000/\text{mm}^3$  é outro desfecho importante na recuperação hematopoética, pois indica usualmente o momento em que o paciente não necessita mais transfusão de plaquetas para evitar sangramentos. A definição

deste desfecho é, pois, o primeiro de sete dias com contagens de plaquetas acima de  $20.000/\text{mm}^3$  atingidos sem a necessidade de transfusão plaquetária. Como ocorre na pega de neutrófilos, o tempo de recuperação das plaquetas varia de acordo com a fonte de células progenitoras hematopoéticas e do tipo de doador. A mediana de recuperação de plaquetas varia de 18 a 28 dias para pacientes que receberam medula óssea e de 11 a 17 para os que receberam células progenitoras periféricas (Pavletic, 1997; Schmitz, 1998; Hansen, 1998; Solano, 1998; Russell, 1999; Powles, 2000). Independentemente da fonte de células progenitoras, a recuperação de plaquetas, assim como a de neutrófilos, é sempre mais lenta nos pacientes que as receberam de doadores não-aparentados (Beelen, 1997; Ringden, 1999). Nos que receberam sangue de cordão umbilical, a recuperação das plaquetas é ainda mais lenta (Rocha, 2000).

Informações sobre a recuperação da linhagem eritrocitária são escassas na literatura. Os parâmetros de avaliação não são padronizados, ao contrário do que ocorre com os neutrófilos e as plaquetas, variando de estudo para estudo. Em virtude da ausência de padronização, os valores encontrados têm uma grande faixa de variação. A mediana de tempo para atingir um hematócrito superior a 30% nos paciente que receberam medula óssea de um doador aparentado oscila entre 37 e 218 dias (Beguin, 1993; Vannucchi, 1997).

Após o transplante de medula óssea, o receptor permanece imunossuprimido por um longo período. Essa imunossupressão bem como sua duração e intensidade devem-se a quatro fatores: não transferência sustentada da imunidade do doador; recapitulação da ontogenia linfóide; profilaxia, efeito e tratamento da DECH; deficiência da função tímica (Parkman, 1997). Conseqüentemente, a recuperação quantitativa da contagem de linfócitos tem uma grande variação nos diversos trabalhos disponíveis. A maioria dos estudos de recuperação linfocitária diz respeito a pacientes que receberam medula óssea ou células periféricas que sofreram uma seleção CD34 positiva ou depleção de linfócitos T (van Leeuwen, 1994; Haddad, 1998; Small, 1999). Nos pacientes que receberam enxerto não manipulado, a mediana de tempo para atingir uma contagem de linfócitos superior a  $300\text{-}500/\text{mm}^3$  varia

de 1,5 a 6 meses quando utilizada medula óssea e é de menos de um mês quando usadas células progenitoras periféricas (Mavroudis, 1996; Pavletic, 1998). A análise das subpopulações de linfócitos mostra uma recuperação mais rápida dos linfócitos NK e CD3+/CD8+ em relação aos linfócitos B e CD3+/CD4+ (Behringer, 1999; Storek, 2001).

A recuperação dos monócitos após transplante de medula óssea alogênico é muito pouco estudada. Um único trabalho mostra uma recuperação da contagem de monócitos acima de  $300/\text{mm}^3$  variando entre 75 e 130 dias (Mavroudis, 1996).

## **2.2 - Complicações do Transplante**

O transplante de células progenitoras hematopoéticas apresenta uma série de complicações, responsáveis por uma morbidade e mortalidade não negligenciáveis. Elas podem ser classificadas em três grupos principais: complicações ligadas ao condicionamento, complicações ligadas à DECH e complicações infecciosas.

### ***2.2.1 - Complicações Ligadas ao Condicionamento***

As complicações ligadas ao condicionamento podem se manifestar sob diferentes formas: doença venoclusiva hepática, pneumopatia intersticial idiopática e microangiopatia trombótica são as mais frequentes. Agrupam-se essas complicações sob a denominação de síndrome de lesão endotelial que decorre, de um lado, de lesões diretas do endotélio vascular e do epitélio e, de outro, da liberação de enorme quantidade de citocinas (a chamada tempestade de citocinas – *cytokine storm*), principalmente interleucina 1 e fa-

tor de necrose tumoral alfa (Holler, 1990). Esses dois fenômenos são os responsáveis pelas diferentes manifestações clínicas dessa síndrome.

A doença venoclusiva hepática é causada pela obstrução não-trombótica de vênulas intra-hepáticas, com conseqüente dano nos hepatócitos centrolobulares e sinusóides subjacentes. O fator desencadeador da obstrução é o dano endotelial determinado pelo condicionamento pré-transplante (Bearman, 1995). A doença venoclusiva hepática usualmente ocorre nas primeiras 3 semanas após o transplante e se caracteriza por uma tríade de sinais: hepatomegalia, icterícia e ganho de peso/ascite (McDonald, 1984). A incidência varia de 1% a 50%, dependendo da série e dos critérios diagnósticos utilizados, e a mortalidade média é de 30% (Ribaud, 2000; Bearman, 2000).

Pneumopatia intersticial idiopática refere-se a um dano difuso pulmonar após o transplante no qual nenhum agente infeccioso foi identificado (Crawford, 1993). O mecanismo do dano é múltiplo, podendo estar relacionado com dano pulmonar direto induzido pela quimio-/radioterapia do condicionamento, com citocinas, com alorreatividade T ou mesmo com infecção viral latente (Ribaud, 2000). Numa série publicada pelo grupo de Seattle, a incidência foi de 7,7% nos primeiros 120 dias, com uma mediana de aparecimento no 21<sup>o</sup> dia após o transplante. Apenas 13% dos pacientes que apresentaram pneumopatia intersticial idiopática estavam vivos após um ano do transplante (Kantrow, 1997).

A mucosite é, do ponto de vista do paciente, a complicação mais freqüente e mais debilitante. Sua gravidade está diretamente ligada à intensidade do condicionamento, embora outros fatores possam contribuir (Sonis, 2001). A mucosite pode ser de forte intensidade, necessitando o uso de nutrição parenteral total se a via oral ficar indisponível. A presença de neutropenia associada predispõe o aparecimento de septicemia (Elting, 1992).

### 2.2.2 - Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

A DECH é uma das principais causas de morbidade e mortalidade após transplante de células-tronco hematopoéticas e decorre da alorreatividade dos linfócitos do enxerto contra os antígenos de histocompatibilidade do hospedeiro. Ela se classifica em aguda, quando ocorre nos 100 primeiros dias após o transplante, ou crônica, quando se verifica após esse prazo. Os pacientes submetidos a transplante de medula óssea alogênico preenchem as três condições definidas por Billingham, em, 1966, para o seu aparecimento (Billingham, 1966):

ter recebido administração de células imunocompetentes;

haver histoincompatibilidade entre doador e receptor;

haver inabilidade do receptor em destruir ou inativar as células transfundidas ou transplantadas.

Pode-se dividir a gênese da DECH aguda em três etapas (Socié, 1998; Ferrara, 1999):

1ª) Os tecidos do hospedeiro são danificados pelo condicionamento ou pelas citocinas liberadas após o condicionamento ou após infecção (IL-1, IL-6, TNF-alfa, etc). Em decorrência disso, os órgãos-alvo da DECH (pele, tubo digestivo e dutos hepáticos) apresentam uma hiper-expressão de moléculas de histocompatibilidade, de moléculas de adesão (VCAM1, ELAM1) e de outras moléculas com atividade procoagulante.

2ª) Além do aumento da expressão de moléculas de histocompatibilidade, uma série de antígenos é processada e peptídeos deles provenientes são exibidos pelas células apresentadoras de antígenos. O complexo molécula de histocompatibilidade/peptídeo é exposto aos linfócitos T circulantes. Quando existe incompatibilidade HLA, a molécula de histocompatibilidade não é reconhecida como própria. Já no caso de transplantes com compatibilidade HLA, os peptídeos ligados à molécula de histocompatibilidade ou antígenos me-

nores de histocompatibilidade é que são reconhecidos como estranhos ao organismo do receptor. Os linfócitos, reconhecendo como estranhas essas moléculas, são ativados, proliferam e secretam IL 2.

3<sup>a</sup>) A presença de IL 2 proveniente dos linfócitos ativados estimula as células mononucleadas do doador a secretar um coquetel de citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF-alfa e interferon-gama. A resposta inflamatória resultante dessa combinação amplifica as lesões teciduais e, por um mecanismo de retroalimentação, aumenta ainda mais a liberação de citocinas e a proliferação/ativação dos linfócitos. Além disso, o próprio linfócito T aumenta sua atividade citotóxica contra as células-alvo da DECH.

A DECH aguda ocorre usualmente entre o 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia após o transplante. Entre 20% e 70% dos pacientes apresentam DECH moderada ou grave (Byrne, 2000; Rocha, 2000). Vários fatores de risco para sua ocorrência após transplante de medula óssea foram identificados, podendo-se dividi-los em fatores relacionados ao receptor/doador (compatibilidade HLA, diferença de sexo entre doador e receptor, idade do receptor), fatores ligados ao transplante (uso de irradiação corporal total em doses elevadas, dose de linfócitos infundidos, dose de imunossuppressores administrados) e fatores pós-transplante (reativação do citomegalovírus, pega precoce, supressão da flora intestinal) (Nash, 1992; Socié, 1998).

Os órgãos-alvo da DECH aguda são a pele, o tubo digestivo e o fígado. Em relação à pele, as manifestações clínicas podem variar de um simples eritema localizado até a síndrome de Lyell. O acometimento digestivo pode se resumir a náuseas ou se manifestar como diarreia profusa e hemorrágica. Colestase é a manifestação clássica do acometimento hepático. A DECH aguda é classificada de 1 a 4 de acordo com os critérios propostos por Glucksberg e colaboradores em, 1974 e que se encontram descritos na tabela 1 (Glucksberg, 1974). A mortalidade varia segundo o grau, podendo atingir até 90% quando o grau é 4.

Tabela 1 - Gradação da doença do enxerto contra o hospedeiro

Gravidade em função do órgão afetado – Estadiamento clínico-laboratorial			
Estádio	Pele	Fígado	Tubo Digestivo
1	Rash maculopapuloso < 25% da superfície corporal	Bilirrubina 2-3 mg/dl	Diarréia ≤ 1000 ml/d (na ausência de causa infecciosa) (≤15 ml / kg/d)* náuseas e vômitos ou anorexia (comprovação histológica)
2	Rash maculopapuloso de 25% a 50% da superfície corporal	Bilirrubina 3,1-5,9 mg/dl	Diarréia > 1000 ml/d (> 15 ml/kg/d)*
3	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina 6-14,9 mg/dl	Diarréia > 1500 ml/d (>20 ml/kg/d)*
4	Eritrodermia generalizada com formação de bolhas e descamação	Bilirrubina >15 mg/dl	Diarréia ≥ 2000 ml/d (≥ 25 ml/kg/d)*
Classificação da DECH de acordo com o grau de gravidade das manifestações			
Grau	Pele	Fígado	Tubo Digestivo
I	1 a 2	0	0
II	0 a 3	0 - 1	0 - 1
III	0 a 3	0 a 4	2 a 4
IV	0 a 3**	0 a 4**	2 a 4**

\*Avaliação da diarréia em pediatria

Os pacientes com diarréia com sangue devem ser considerados, no mínimo, como estágio 2, podendo atingir os estádios 3 ou 4 dependendo do volume.

A gravidade deve ser julgada no momento da manifestação mais intensa da DECH.

\*\* Estádio e severidade da DECH de grau IV idêntico ao grau III porém com Karnofsky < 30%.

As estratégias para a prevenção da DECH envolvem a eliminação ou bloqueio da ativação dos linfócitos. A remoção dos linfócitos da medula óssea (ou do sangue periférico coletado por aférese) resulta em redução importante na incidência da DECH, acompanhada, porém, de aumento significativo na taxa de recidiva e de não-pegada do enxerto após o transplante (Marmont, 1991). A medida profilática mais utilizada é uma combinação de imunossuppressores, especialmente ciclosporina e metotrexato.



Embora a maior parte dos pacientes submetidos a transplante de medula óssea alogênico relacionado não apresente DECH moderada ou severa, sua incidência também não é baixa, gerando uma alta taxa de morbidade e mortalidade. O tratamento padrão da DECH aguda envolve o uso de corticóides em doses elevadas, usualmente acima de 2 mg/kg de peso de prednisona ou metilprednisolona (Socié, 1998). No caso de falha na terapia com corticóides, outras abordagens podem ser tentadas, como o uso de imunoglobulinas antilinfócitos, tacrolimus, micofenolato mofetil ou anticorpos monoclonais.

A DECH crônica (após o 100º dia do transplante) ocorre em cerca de 50% dos casos. Ela pode ser classificada em limitada ou extensiva (Shulman, 1980) e se assemelha a uma doença sistêmica auto-imune. Os órgãos mais afetados são pele, fígado, cavidade oral e olhos. A forma crônica determina um déficit imunológico importante, com diminuição da quantidade e da qualidade dos linfócitos T e B e é responsável por uma taxa de mortalidade em torno de 5% a 10% dos pacientes transplantados. O fator de risco mais importante é a ocorrência prévia da forma aguda da doença (Carlens, 1998). Assim, a melhor profilaxia para a DECH crônica é também a profilaxia para a forma aguda. No seu tratamento, a combinação de prednisona com ciclosporina é a mais utilizada. Outras medicações empregadas são tacrolimus, micofenolato mofetil, talidomida e PUVAterapia (Vogelsang, 2001).

### 2.2.3 - Complicações Infecciosas

As complicações infecciosas são uma das principais, senão a principal, causa de morbidade e mortalidade em transplantados. Vários fatores de risco para infecções estão presentes nesses pacientes, como o longo período de neutropenia, a toxicidade ligada ao condicionamento, a utilização de cateteres de longa permanência e a imunossupressão intensa e prolongada causada, em parte, pela profilaxia da DECH e, em parte, pela lenta re-

constituição da imunidade (mais lenta ainda em presença de DECH) (Pirsch, 1986; Sayer, 1994; Yuen, 1998; Richardson, 1998).

Pode-se dividir o período de risco infeccioso após o transplante em três fases distintas (Ljungman, 2000):

**1ª fase** - É o chamado período da aplasia, que vai desde o dia do transplante até a pega do enxerto, durando, em média, de 21 a 28 dias. Nesse período o risco infeccioso é mediado principalmente pela neutropenia e pela quebra de barreiras naturais (a pele, pelo uso de cateter, e a mucosa, pela mucosite secundária ao condicionamento). Outros fatores também podem influenciar o aparecimento de infecções nessa fase, como a depressão da função dos macrófagos, dos linfócitos T e NK. As bactérias mais freqüentemente isoladas são os cocos Gram-positivos, principalmente os estafilococos coagulase-negativos, e os bacilos Gram-negativos (Williamson, 1999). As infecções por leveduras (basicamente *Candida sp.*) e por *Herpes simplex* são também freqüentes (Wingard, 1999). Tem se observado, em particular, um aumento na freqüência dos episódios de candidemia nos pacientes transplantados (Goodrich, 1991).

**2ª fase** - A segunda fase é a da DECH, em que o risco infeccioso é determinado principalmente pela redução importante na função (e, em menor grau, do número) dos linfócitos T. Outros fatores importantes são as neutropenias secundárias e a eventual persistência de quebra de barreiras nos pacientes que permanecem com cateter. A duração desta fase é variável, podendo ir de apenas algumas semanas naqueles pacientes que receberam enxerto de doador familiar HLA-compatível e que não apresentaram DECH, até vários meses nos pacientes com DECH persistente ou que receberam enxerto não-aparentado. As infecções predominantes são reativações do citomegalovírus, infecções bacterianas e infecções fúngicas por *Candida sp.* e *Aspergillus sp.* Infecções por *Toxoplasma sp.* e *Pneumocystis carinii*, outrora freqüentes, são raras atualmente graças ao uso de profilaxias medicamentosas (Martino, 2000, Vasconcelles, 2000).

**3ª fase** - Caracteriza-se por uma deficiência na função dos linfócitos B, frequentemente combinada com uma disfunção dos linfócitos T, ocorrendo em pacientes com DECH crônica. Esta fase pode não ocorrer nos pacientes que não apresentam DECH crônica. Em compensação, pode durar vários anos nos que desenvolveram a DECH na forma crônica severa ou persistente. Infecções virais, como a causada pela *Herpes zoster*, e bacterianas, como as provocadas por germes encapsulados, são freqüentes nesse período (Kahls, 1988; Steer, 2000).

### 2.2.3.1 - Infecções Bacterianas

A maioria das infecções bacterianas ocorre precocemente após o transplante, o que corresponde usualmente ao período de aplasia após o condicionamento. A neutropenia é um fator de risco conhecido para infecções bacterianas nos pacientes imunodeprimidos. Esse risco aumenta segundo a duração e a severidade da neutropenia (Pizzo, 1993). As lesões resultantes da quimio ou radioterapia do condicionamento e a utilização de cateteres centrais de longa permanência comprometem a proteção oferecida pela pele e pela mucosa, aumentando ainda mais a predisposição às infecções (Kruger, 1999). Cerca de 85% a 100% dos pacientes submetidos a transplante apresentarão pelo menos um episódio febril durante o período de aplasia e em torno de 35% a 50% dos casos o agente etiológico não será identificado (Kolbe, 1997; Kruger, 1999; Mullen, 2000). Dos germes isolados, cerca de 50% a 70% consistem de bactérias Gram-positivas (Yeun, 1998; Williamson, 1999; Mullen, 2000). Os microorganismos mais freqüentemente isolados são os estafilococos coagulase-negativos, seguidos pelos estreptococos e enterococos (van Burik, 1999). Entre os Gram-negativos, que compreendem 20% a 30% dos germes isolados, predominam as enterobactérias (*E. coli*, *K. pneumoniae*) e a *Pseudomonas aeruginosa* (Kruger, 1999; Mullen, 2000). Apro-

ximadamente 25% dos óbitos ocorridos precocemente após o transplante estão ligados a bacteremias. Um achado interessante é que a presença de bacteremia na fase de aplasia está ligada a óbito posterior por infecção fúngica, relação esta provavelmente relacionada à quebra de barreiras (Sparrelid, 1998). As pneumonias bacterianas após o transplante de medula óssea ocorrem em torno de 15% dos casos e também apresentam taxa de mortalidade elevada (em cerca de 20% dos episódios) (Lossos, 1995).

### 2.2.3.2 - Infecções Fúngicas

Os fungos são agentes infecciosos relativamente freqüentes após o transplante de medula óssea alogênico. Os dois germes mais comumente isolados são *Candida sp.* e *Aspergillus sp.*, sendo o primeiro mais comum na fase precoce após o transplante e o segundo ocorrendo de forma mais tardia, embora possa também aparecer mais precocemente em algumas circunstâncias (van Burik, 1999). Os fatores que predispõem ao aparecimento de infecção fúngica são período prolongado de aplasia, quebra das barreiras de proteção naturais, redução da imunidade celular e presença da DECH (Morrison, 1994; Wingard, 1999).

Antes do surgimento dos antifúngicos do tipo “azol” (fluconazol, itraconazol), *Candida albicans* era a levedura mais freqüentemente isolada nos pacientes submetidos a transplante de medula óssea (Wingard, 1999). Com o uso sistemático de fluconazol, observou-se inicialmente uma redução significativa na sua incidência. Porém, com o decorrer do tempo, notou-se um aumento de outras espécies de *Candida* (*C. Krusei* e *C. tropicalis* são as mais freqüentes). A maioria das infecções por *Candida* provém de leveduras que colonizam normalmente o trato gastrointestinal e que conseguem penetrar na circulação sanguínea. Mesmo com o surgimento de cepas resistentes aos esquemas de profilaxia antifún-

gica, tem-se observado redução no óbito ligado diretamente à infecção por *Candida sp.* (Marr, 2000).

A aspergilose invasiva, mais freqüentemente pulmonar, pode acometer até 10% dos pacientes que receberam transplante alogênico, com uma taxa de mortalidade superior a 90% (Denning, 1996; Richardson, 1998; Kruger, 1999). A mediana de aparecimento situa-se entre o 50º e 100º dia após o transplante. A apresentação clínica da doença pode variar e, no início, os pacientes não costumam apresentar nem febre nem sintomas pulmonares (Jantunen, 2000). Embora a neutropenia também seja um fator de risco para as infecções por *Aspergillus*, a maioria dos pacientes acometidos não está neutropênica no momento do diagnóstico. A presença da DECH ativa e a utilização de corticóides são fatores de risco importantes para o surgimento de infecções por *Aspergillus* (Ribaud, 1999).

### 2.2.3.3 - Infecções Virais

O herpesvírus era um germe extremamente prevalente nos pacientes submetidos a transplante de medula óssea. A utilização profilática do aciclovir reduziu sua incidência de 80% para 5% nos soropositivos (van Burik, 1999). A maioria das infecções herpéticas que ainda se manifestam em pacientes transplantados ocorre na orofaringe ou na região perianal. O surgimento dessas infecções em vigência de profilaxia com aciclovir pode estar relacionado à resistência viral a esse agente.

O citomegalovírus (CMV) também pertence à família dos herpesvírus. Dividem-se as infecções por CMV em reativação (quando existe viremia porém sem acometimento importante de algum órgão-alvo) e a chamada doença por CMV (quando ocorre comprometimento de algum órgão de maneira importante). Ele era responsável pela maioria das pneumopatias intersticiais após transplante, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente

90% (Armitage, 1994). Após o surgimento do ganciclovir e do *foscarnet*, das medidas de profilaxia (como o uso de produtos de leucotizados) e do tratamento dito preemptivo, a incidência da doença por CMV e sua mortalidade reduziram-se significativamente (Prentice, 1997; Manteiga, 1998; Boeckh, 1998). Por outro lado, a reativação permanece muito frequente e seu tratamento pode ocasionar uma morbidade importante, em particular devido ao impacto da neutropenia, que acompanha frequentemente a utilização do ganciclovir, e da insuficiência renal que se segue à administração do *foscarnet* (Boeckh, 1996). Os principais fatores de risco para a reativação e para a doença por CMV são o *status* sorológico CMV (antes do transplante) do receptor/doador, a depleção dos linfócitos T, a presença da DECH aguda e a idade do receptor (Meyers, 1986; Takenaka, 1997).

O vírus varicela-zoster, outro membro da família dos herpesvírus, é responsável por infecções (na verdade reativações) mais tardias, tanto na forma localizada (infecção no dermatomo) quanto na disseminada. O uso de aciclovir profilático praticamente acaba com sua incidência enquanto ele for utilizado. Cerca de 20% a 50% dos pacientes apresentarão reativação quando da suspensão da profilaxia (Steer, 2000).

Infecções por adenovírus ocorrem em torno de 5% a 20% dos pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea, sendo seu pico de incidência entre 1 e 2 meses após o procedimento (Flomenberg, 1994; van Burik, 1999). Cerca de um terço desses pacientes apresentarão doença por adenovírus, principalmente cistite hemorrágica, hepatite, colite ou pneumonia (Flomenberg, 1994). A presença de DECH e o transplante em paciente pediátrico são fatores de risco para o aparecimento de infecção por adenovírus (Howard, 1999).

### 2.3 - A Molécula CD34 e a Célula-Tronco Hematopoética

O sucesso de um transplante de medula óssea decorre da implantação e pega de células-tronco hematopoéticas no microambiente da medula óssea. A produção contínua de células sanguíneas será garantida por essa pequena população de células capazes de auto-renovação, para perpetuar o estoque de células-tronco, e de diferenciação, produzindo uma prole de células engajadas em uma linhagem específica (megacariocítica, mielóide, linfóide ou eritróide). O controle da hematopoese (auto-renovação, engajamento em uma determinada linhagem, proliferação e maturação) é feito tanto por mecanismos intracelulares (oncogenes, reguladores do ciclo celular e fatores de transcrição) como por fatores extracelulares (através da interação entre as células-tronco hematopoéticas, as células do microambiente, como os fibroblastos, células endoteliais, células reticulares, osteoblastos, etc. e as citocinas produzidas pelo microambiente) (Siena, 2000).

A caracterização da célula-tronco hematopoética não é evidente. Morfologicamente é impossível separá-la de um linfócito, tal sua semelhança. Diversos testes *in vitro*, como os ensaios clonogênicos do tipo GM-CFU ou LTC-IC, embora evidenciem a existência dessa célula através da comprovação de suas propriedades de proliferação e auto-renovação, não servem para caracterizá-la. Talvez o grande passo dado para se identificar a célula-tronco hematopoética tenha sido a caracterização de marcadores presentes em sua membrana. Dentre esses marcadores, o mais importante é o chamado CD34.

CD34 é uma glicofosfoproteína expressa em células-tronco hematopoéticas primitivas e nas precocemente engajadas em alguma linhagem hematopoética. Também está presente nas células endoteliais de pequenos vasos e em fibroblastos embrionários (Krause, 1996). Uma parte das células das leucemias agudas (mielóide e linfóide) igualmente expressam em graus variados a molécula CD34 (Drenou, 1996). As células que apresentam em sua membrana a molécula CD34 perfazem cerca de 1% a 3% das células mononucleares

da medula óssea e entre 0,001% e 0,1% das células nucleadas do sangue (Drenou, 1996). A prova de que a molécula CD34 caracterizava a célula-tronco hematopoética veio da evidência de que células CD34+ purificadas podiam iniciar culturas de longo prazo e também reconstituir a hematopoese em cobaias (Baech, 2000).

A descoberta da molécula CD34 foi resultado de uma estratégia para desenvolver anticorpos que reconhecessem especificamente antígenos expressos em pequenas subpopulações da medula óssea e ausentes em células maduras do sangue e de linfócitos. A molécula CD34 está presente não só na célula-tronco hematopoética primitiva como também nas células progenitoras engajadas em uma ou mais vias de diferenciação: unidade formadora de colônias (*colony-forming unit* – CFU) macrofágicas, CFU granulocítica, CFU granulocítica-macrofágica, CFU megacariocítica, etc. (Drenou, 1996). Na verdade, podem-se caracterizar duas populações de células CD34 positivas: uma chamada de CD34 *bright*, que apresenta uma maior quantidade de moléculas CD34 na sua superfície, e que é a população mais primitiva, e outra CD34 *dim*, com menor quantidade de CD34 na superfície, e que perfaz as células já engajadas em alguma via de diferenciação (Krause, 1996).

O gene da molécula CD34 foi clonado em 1994 e consiste em 9 éxons localizados no cromossoma 1. O gene produz uma proteína de 115 kD transmembrânica semelhante à família das sialomucinas (Drenou, 1996). Suas funções na célula são provavelmente duas: adesão/localização das células-tronco hematopoéticas na medula óssea e regulação na diferenciação (Krause, 1996; Siena, 2000). Embora importantes na caracterização da célula-tronco hematopoética, modelos de animais *knock-out* para o gene CD34 são viáveis e capazes de se reproduzir e sua hematopoese aparenta estar intacta, exceto por uma quantidade menor de progenitores em cultura (Krause, 1996).



O reconhecimento da molécula CD34 presente na superfície das células-tronco hematopoéticas é feito por anticorpos dirigidos contra diferentes epitopos da porção extracelular da molécula (Krause, 1996). Embora sua função não tenha sido totalmente elucidada, as aplicações clínicas decorrentes da sua identificação já são amplamente utilizadas. O uso da citometria de fluxo permite a quantificação do número de células CD34+ presentes em diferentes tipos de enxerto (medula óssea, sangue ou sangue de cordão umbilical). Através dessa mesma técnica também é possível quantificar a presença de células CD34+ em blastos de leucemia aguda. Finalmente, pode-se também utilizá-la para a purificação de células-tronco hematopoéticas para uso em laboratório ou em transplantes. A célula-tronco hematopoética pode ser ainda melhor caracterizada quando se empregam outros anticorpos dirigidos contra diferentes moléculas presentes na sua superfície. Em linhas gerais, a célula-tronco hematopoética é caracterizada por ser CD34+, CD38-, HLA-DR-, Thy-1+ e CD45RA- (Rizzoli, 1997).

#### **2.4 - Quantificação das Células Progenitoras Hematopoéticas Presentes no Enxerto e seu Impacto no Desfecho dos Transplantes**

Diversos fatores interferem no desfecho do transplante de células-tronco hematopoéticas, alguns dos quais já bem definidos na literatura. A tabela 2 contém um resumo dos fatores que influenciam a mortalidade relacionada ao transplante e à recidiva de neoplasias (adaptado de Gratwohl, 2000).

**Tabela 2** - Fatores influenciando mortalidade relacionada ao transplante e à recidiva após transplante de células-tronco hematopoéticas

Fatores pré-transplante	Mortalidade relacionada ao transplante	Recidiva
<b>Paciente</b>		
Idade	+++	–
Sexo	–	–
Performance	++	–
<b>Doença</b>		
Tipo / subtipo	+	+
Estadiamento	++	+++
No diagnóstico	+	+
No transplante	++	+++
Tempo entre diagnóstico e transplante	++	++
<b>Disfunção orgânica</b>		
Sorologia viral	++	–
<b>Doador</b>		
Tipo de doador	+++	+++
Fonte de célula	+ ?	?
Número de transplantes	++	++
Histocompatibilidade	+++	+++
Sorologia viral	++	–
<b>Equipe médica</b>		
Experiência	+ ?	–
Situação geográfica	+	+
<b>Fatores relacionados ao procedimento</b>	<b>Mortalidade relacionada ao transplante</b>	<b>Recidiva</b>
<b>Condicionamento</b>		
Intensificado	↑	↓
Reduzido	↓	↑
<b>Dose de células</b>		
Aumentada	↓	?
<b>Profilaxia da DECH</b>		
Intensificada	↓	↑
Reduzida	↑	↓

Influência +++ forte, ++ média, + fraca, ? ainda não bem caracterizada, ↑ risco aumentado, ↓ risco reduzido.

Embora variáveis relacionadas à doença de base, ao paciente ou ao doador influenciem significativamente os desfechos mais importantes após transplante de células-tronco hematopoéticas, a quase impossibilidade de modificá-las as tornam de pouca valia. Na maioria das vezes o doador localizado é único. Em algumas situações, como nos transplantes não-relacionados, pode-se optar pelo melhor doador baseado na histocompatibilidade ou na fonte de células (sangue de cordão umbilical *versus* medula óssea *versus* sangue periférico). No transplante relacionado, nas raras vezes em que há mais de um doador na família, pode-se selecioná-lo pelo *status* sorológico para o CMV ou pelo número de gestações prévias (no caso de doadora mulher). Dos fatores relacionados diretamente ao procedimento, as modificações feitas tanto no condicionamento quanto na profilaxia da DECH se refletem de maneira inversa sobre a mortalidade e a recidiva. O fator potencialmente modificável e que influencia a mortalidade e talvez a recidiva é a dose de células infundidas.

Desde a década de 60 sabe-se que, em modelos animais, a dose de células-tronco/progenitoras hematopoéticas infundida no enxerto poderia influenciar a velocidade e a qualidade da reconstituição hematopoética após condicionamento mieloablativo (Siena, 2000). Diferentes parâmetros foram estudados para avaliar o impacto da dose celular no transplante de células-tronco hematopoéticas. O método mais simples, rápido e ainda hoje mais utilizado no transplante alogênico com medula óssea é a quantificação do número total de células nucleadas presentes no enxerto.

O grupo de Seattle foi pioneiro no estudo da dose de células presentes no enxerto. Desde a década de 70, em sucessivos trabalhos, esse grupo tem demonstrado que uma dose de células nucleadas inferior a  $3 \times 10^8$ /kg está associada com risco aumentado de rejeição do enxerto em pacientes portadores de aplasia medular submetidos a transplante de medula óssea alogênico (Storb, 1977). Na década de 80, o mesmo grupo publicou uma série de 252 pacientes também portadores de aplasia medular em que, além da confirmação da influência da dose celular sobre a taxa de rejeição do enxerto, foi também demonstrada sua pequena, porém significativa, repercussão sobre a recuperação dos neutrófilos e pla-

quetas. Mais importante, mostra de maneira clara o impacto da dose celular sobre a mortalidade (Niederwieser, 1988). Ainda em 1997 a mesma equipe publicou outra grande série de pacientes, dessa vez portadores de leucemias agudas submetidos a transplante de medula óssea não-aparentado (Sierra, 1997). Nesse estudo, uma dose de células nucleadas no enxerto superior a  $3,65 \times 10^8/\text{kg}$  estava associada a uma recuperação mais rápida de neutrófilos, linfócitos e plaquetas e a uma menor taxa de DECH aguda severa. Além disso, essa dose mais alta também estava associada, nos pacientes transplantados em remissão, à redução na taxa de mortalidade relacionada ao transplante e à melhora na taxa de sobrevida livre de leucemia. Essa influência manteve-se mesmo após correção para eventuais fatores de confusão. Aparentemente a repercussão sobre a mortalidade deveu-se, segundo os pesquisadores, a uma redução na taxa de infecção imediata após o transplante, a qual poderia repercutir favoravelmente sobre a taxa de DECH, sabidamente uma causa de mortalidade após transplante alogênico. Mais recentemente, esses mesmos autores atualizaram seus resultados, confirmando os achados numa série maior de pacientes (Sierra, 2000). Pesquisadores ingleses, em uma série de publicações feitas na segunda metade da década de 90, também demonstraram o impacto da dose de células nucleadas sobre diferentes desfechos após transplante de medula óssea alogênico. Uma dose superior a  $2,6 \times 10^8/\text{kg}$  reduziu de maneira significativa a mortalidade relacionada ao transplante e, conseqüentemente, aumentou a sobrevida livre de doença (Metha, 1996). Uma dose acima de  $2,5 \times 10^8/\text{kg}$  também mostrou reflexos sobre a mortalidade devido a infecções, hemorragias ou não-pegas em uma série de 712 pacientes submetidos a transplante de medula óssea alogênico (Metha, 1997A). O mesmo grupo, em 1998, observou que uma dose de células acima de  $2,42 \times 10^8/\text{kg}$  associava-se com maior taxa de recidiva em pacientes portadores de leucemia mielóide aguda que receberam transplante de medula óssea, em sua grande maioria após condicionamento com melfalano ou ciclofosfamida e irradiação corporal total (Powles, 1998). Outra equipe inglesa, de Oxford, igualmente demonstrou que uma dose de células nucleadas superior a  $2,17 \times 10^8/\text{kg}$  presente em medula óssea coletada de doadores não-aparen-

tados e infundida em pacientes portadores de leucemia aguda repercutiu significativamente na pega do enxerto. Ficou demonstrado ainda que uma dose mais elevada reduziu significativamente a mortalidade relacionada ao transplante com tendência a aumentar a sobrevida global (Byrne, 2000). No transplante singênico, a dose de células nucleadas infundidas também repercute nos diferentes desfechos. Barrett e colaboradores publicaram, em 2000, uma série de 100 pacientes que receberam enxerto de medula óssea proveniente de doador singênico para o tratamento de leucemia aguda ou leucemia mielóide crônica. Em resumo, uma dose superior a  $3 \times 10^8/\text{kg}$  resultou em redução da taxa de recidivas e em aumento na sobrevida livre de leucemia. Os pesquisadores explicam esse resultado por uma reconstituição hematológica/imunológica mais robusta (reduzindo complicações infecciosas precoces) e por um efeito enxerto contra leucemia (contra antígenos presentes somente nas células leucêmicas) desencadeado por uma dose mais elevada de linfócitos no enxerto (Barrett, 2000). Com base nesses estudos, concluiu-se que um número de células nucleadas na medula óssea acima de  $2 \times 10^8/\text{kg}$  assegura uma pega correta na maior parte dos transplantes alogênicos, sendo a dose recomendada atualmente na literatura (Cottler-Fox, 1998). No transplante autólogo envolvendo medula óssea, hoje em desuso, a infusão de um número de células nucleadas infundidas superior a  $2 \times 10^8/\text{kg}$  também resultou em sobrevida livre de doença significativamente melhor, além de menor mortalidade relacionada ao transplante (Metha, 1997B). Também no transplante com sangue de cordão umbilical a dose de células nucleadas tem mostrado forte influência sobre os diferentes desfechos. Em 1997, Gluckman e colaboradores mostraram que uma dose de células nucleadas acima de  $3,7 \times 10^7/\text{kg}$  aumentava significativamente a taxa e a velocidade de pega dos neutrófilos, além de melhorar a sobrevida global (Gluckman, 1997). Em relação ao transplante autólogo utilizando células-tronco hematopoéticas provenientes do sangue periférico, o número de células nucleadas totais ou o número de células mononucleadas presentes no enxerto não apresenta forte correlação com nenhum dos desfechos significativos após transplante (To, 1997). Outros

métodos de estimação do conteúdo de células-tronco hematopoéticas substituíram com vantagens a simples determinação de células nucleadas totais nesta situação específica.

A numeração das células nucleadas presentes no enxerto, embora se revista de importância prognóstica após transplante, não fornece nenhuma informação sobre a composição ou a riqueza do mesmo em células-tronco hematopoéticas. Uma maneira indireta de se obter essa informação é pela quantificação das CFU-GM (*CFU – granulocyte and monocyte* – colônias formadoras de unidades de granulócitos e monócitos). Estudos inicialmente realizados em transplante autólogo de medula óssea mostraram correlação entre a dose de CFU-GM e a reconstituição hematopoética: uma dose acima de  $15-20 \times 10^4$  CFU-GM/kg associava-se com recuperação mais rápida de neutrófilos e plaquetas (To, 1997). Outro trabalho evidenciou pela primeira vez correlação entre dose maior de células-tronco (estimadas pela CFU-GM) e recuperação acelerada de todas as linhagens hematopoéticas pós-transplante, menor necessidade de transfusão de eritrócitos e plaquetas e alta hospitalar mais precoce. Contudo, a pesquisa envolveu a infusão simultânea de medula óssea e sangue periférico (Gianni, 1989). Em relação ao transplante alogênico empregando medula óssea, a relação entre CFU-GM e pega de neutrófilos e de plaquetas é controversa. Bacigalupo e colaboradores não verificaram relação entre a dose de CFU-GM administrada e a recuperação de neutrófilos ou de plaquetas, entretanto observaram melhor reconstituição hematológica a longo prazo (após 80 dias do transplante) nos pacientes que receberam doses mais altas (Bacigalupo, 1995). Já Hassan e colaboradores constataram recuperação mais rápida dos neutrófilos nos pacientes para os quais foram administradas doses mais elevadas de CFU-GM. Essa correlação não foi confirmada no tocante à recuperação das plaquetas (Hassan, 1997). De maior significado clínico foi a observação de Bacigalupo e colaboradores que encontraram relação significativa entre doses mais elevadas de CFU-GM (acima de  $2,4 \times 10^4$ /kg) e diminuição da mortalidade relacionada ao transplante e aumento na sobrevida global (Bacigalupo, 1995). Embora seu impacto nos diferentes desfechos após

transplante de células-tronco hematopoéticas tenha sido demonstrado, sua utilidade é ofuscada pela demora em se obter o resultado (entre 10 e 14 dias) e pela dificuldade de padronização do método em virtude das diversas variáveis envolvidas na sua execução (Reis, 1999; Siena, 2000). Seu uso no contexto do transplante alogênico é pouco prático e, hoje em dia, não é utilizado rotineiramente.

Nos últimos 10 anos, a expressão da molécula CD34 vem sendo utilizada de maneira crescente para estimar o número de células progenitoras presentes no enxerto. Em, 1991, Siena e colaboradores relataram o uso da citometria de fluxo na quantificação de células CD34 para estimar a quantidade de células progenitoras hematopoéticas utilizadas para transplante autólogo. O estudo evidenciou forte correlação entre a dose de células CD34 e a de CFU-GM, considerada na época o padrão-ouro na determinação de células-tronco hematopoéticas (Siena, 2000). A disseminação da dosagem de CD34 como método para determinação da dose de células-tronco hematopoéticas decorreu basicamente da simplicidade, rapidez, precisão, sensibilidade e reprodutibilidade da técnica. Diversos grupos descreveram técnicas diversas para a quantificação de células CD34+ por citometria de fluxo. Em virtude disso, os resultados iniciais variavam de acordo com o método empregado. Iniciativas como a promovida pela *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) serviram para padronizar os métodos de maneira a tornar possível a troca de informações entre os diversos grupos (Reis, 1999).

A importância da quantificação da expressão da molécula CD34 foi inicialmente demonstrada no campo do transplante autólogo de células progenitoras periféricas. Uma dose superior a  $1 \times 10^6$ /kg foi estabelecida como o mínimo necessário para a pega do enxerto (Drenou, 1996). Existe uma relação dose-resposta entre a dose de células CD34 e a recuperação dos neutrófilos acima desse valor. Weaver e colaboradores observaram redução no tempo de pega de neutrófilos e também de plaquetas à medida que se aumentava a dose de células CD34 acima de  $0,5 \times 10^6$ /kg (Weaver, 1995). Outros grupos obtiveram os mesmos resultados descritos inicialmente (Kiss, 1997, Klumpp, 1997). Entretanto, alguns pesqui-

sadores demonstraram que, embora a velocidade de recuperação das plaquetas se correlacionasse diretamente com a quantidade de células CD34 infundidas, a recuperação dos neutrófilos correlacionava-se com a dose de CD34 até um determinado patamar, acima do qual o aumento da dose não resultava em aceleração na pega de neutrófilos (Bensinger, 1995, Ketterer, 1998). Além da influência sobre os principais parâmetros de recuperação hematológica a curto prazo após transplante autólogo de células-tronco periféricas, a dose de células CD34 infundidas também se reflete na reconstituição hematológica a longo prazo, reduzindo as transfusões pós-transplante e o número de internações. Kiss e colaboradores comprovaram que uma dose de células CD34 acima de  $5 \times 10^6/\text{kg}$  reduzia a necessidade de transfusões de plaquetas. Além disso, todos os parâmetros hematológicos após 180 dias (hemoglobina, neutrófilos e plaquetas) mostravam-se significativamente mais elevados no grupo que recebeu a dose mais elevada de células CD34 (Kiss, 1997). Pérez-Simon e colaboradores verificaram que uma dose de células CD34 mais elevada estava associada à redução na perda transitória da pega de neutrófilos e de plaquetas, na necessidade de transfusão de hemácias e plaquetas, nos dias de febre, na necessidade de hospitalização e no uso de antibióticos no primeiro ano após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas periféricas (Pérez-Simon, 1999). O mesmo resultado foi encontrado por Schulman e colaboradores (redução na necessidade de transfusão de hemácias e plaquetas, período mais prolongado de internação e maior necessidade de uso de antibióticos e antifúngicos) e por Amigo e colaboradores (redução nos episódios de citopenias 6 e 12 meses após o transplante) (Amigo, 1999; Schulman, 1999). Além disso, o grupo de Washington demonstrou uma redução nos custos do transplante de cerca de US\$ 5.000 (Schulman, 1999).

Informações sobre a relação entre a dose de CD34 e a reconstituição hematológica e outros desfechos importantes ainda são escassas nos transplantes alogênicos que utilizam medula óssea como fonte de células-tronco hematopoéticas. A maioria das pesquisas foi feita com medulas manipuladas (que sofreram depleção de linfócitos), provenientes de doadores não-aparentados ou em situações de haplo-identidade. O grupo do *National*



*Institutes of Health* (NIH) em Bethesda, nos Estados Unidos, publicou o primeiro trabalho correlacionando dose de CD34 no enxerto e diferentes desfechos após transplante de medula óssea proveniente de um doador familiar que sofreu T- depleção. Nessa pequena série de 28 pacientes ficou demonstrado que uma dose de células CD34 superior a  $1 \times 10^6/\text{kg}$  aumentava significativamente a sobrevida global, além de diminuir a mortalidade relacionada ao transplante em cerca de 10 vezes. Não houve diferença significativa na recuperação de neutrófilos após o transplante para os grupos que receberam menos de 1, entre 1 e 2 e acima de  $2 \times 10^6/\text{kg}$  células CD34. Entretanto, havia melhor recuperação de monócitos e de plaquetas, além de tendência a melhor recuperação de linfócitos com doses mais altas de células CD34. Os dias de hospitalização também foram reduzidos com doses mais elevadas. Os autores concluem que o efeito da dose de células CD34 na mortalidade é mediado por uma redução na taxa de infecções e por uma melhor recuperação hematológica (Mavroudis, 1996). O mesmo grupo publicou, no ano de 2000, uma nova série de pacientes que receberam medula óssea ou células-tronco periféricas T-depletadas de um doador familiar, confirmando a importância da dose de células CD34 na sobrevida global dos pacientes (68% para os pacientes que receberam dose superior a  $3 \times 10^6/\text{kg}$  versus 10% para os que receberam menos de  $1 \times 10^6/\text{kg}$ ). Além disso, ficou demonstrada uma relação entre doses acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  células CD34 e uma redução importante na taxa de recidiva após o transplante (13,5% versus 48%) (Bahçeci, 2000). O fato de o estudo misturar fontes de células-tronco diversas (medula óssea e sangue periférico) impede uma análise mais criteriosa sobre a relação entre dose de células CD34 e recidiva, embora pareça lógico que os achados de menor recidiva com doses maiores de células nucleadas possam ser extrapolados para a dose de células CD34.

Em relação a transplante alogênico empregando medula óssea não manipulada, ainda hoje a forma mais freqüente de transplante alogênico, um estudo apresentado no encontro da *American Society of Hematology* (ASH), em 1999, por Anasetti, mostrou que, em uma população que recebeu o enxerto de doadores não-aparentados, uma dose maior de

células CD34 proporcionou recuperação mais rápida de plaquetas e redução na incidência de neutropenias após a pega. Também ocorreram diminuição na mortalidade relacionada ao transplante e aumento na sobrevida global dos pacientes que receberam mais de  $2,5 \times 10^6/\text{kg}$  células CD34. Como em outros estudos, a recuperação dos neutrófilos não foi afetada pela dose de células CD34 (Anasetti, 1999). Outra pequena série de 39 pacientes que receberam medula óssea ou células-tronco periféricas não manipuladas de um doador familiar HLA-*idêntico* mostrou que uma dose de células CD34 acima de  $2 \times 10^6/\text{kg}$  estava correlacionada com melhora na sobrevida global e na sobrevida livre de eventos e com redução significativa da mortalidade relacionada ao transplante. Não foi encontrada nenhuma relação significativa entre a dose de células CD34 e a recuperação de neutrófilos ou plaquetas (Singhal, 2000). Outro estudo preliminar, levado a efeito no Hospital Saint Louis, em Paris, evidenciou correlação entre a sobrevida global e a mortalidade nos 100 primeiros dias de transplante com a infusão de doses elevadas de células CD34. Não se verificou, mais uma vez, correlação entre a pega de neutrófilos e o número de CD34 infundidos (Moraniu-Zamfir, 2001).

Estudos em transplante alogênicos empregando exclusivamente células-tronco periféricas associaram doses mais elevadas de células CD34 com recuperação mais rápida de neutrófilos e plaquetas (Ilhan, 1999, Siena, 2000). Uma pesquisa recente de um grupo espanhol mostrou que, em pacientes transplantados com células CD34 positivas periféricas selecionadas de um doador familiar, a recuperação de plaquetas foi mais rápida com doses mais elevadas de células. Entretanto, a recuperação de neutrófilos, linfócitos e monócitos não foi afetada pela dose de células CD34 recebidas; surpreendentemente, doses de células CD34 acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  estavam associadas a uma sobrevida menor que a dos pacientes que receberam doses entre  $1-3 \times 10^6/\text{kg}$ , sobrevida esta provavelmente influenciada por uma maior mortalidade relacionada ao procedimento nos pacientes que receberam doses mais elevadas (Urbano-Ispizua, 2001). Qualquer extrapolação desses resultados para o contexto do transplante com medula óssea é precipitada. A célula CD34 periférica mobilizada por fatores de crescimento apresenta características diversas das obtidas na medula óssea. Além

disso, a própria manipulação do enxerto interfere de maneira significativa no conteúdo das células chamadas “facilitadoras”, subtipos de linfócitos com repercussões importantes na pega (Rocha, 2001).

### **3 - HIPÓTESE DE TRABALHO**

---

## 3 – HIPÓTESE DE TRABALHO

---

Pela revisão da literatura restou clara a importância da dose de células CD34 nos diversos desfechos após o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênicas, especialmente quando se utiliza medula óssea como fonte. Entretanto, o que ainda não está suficientemente esclarecido é como se dá essa influência. Nos diversos estudos mencionados não houve um reflexo significativo da dose de células CD34 sobre a recuperação dos neutrófilos. Sabe-se que a neutropenia é um fator de risco maior para infecções em pacientes com patologias hematológicas ou oncológicas e que as infecções são uma das grandes causas de óbito em transplantados. Sendo assim, se houvesse uma recuperação mais rápida dos neutrófilos, reduzir-se-iam o período de neutropenia, o risco de infecção e, conseqüentemente, a mortalidade, em particular a relacionada ao procedimento. Porém isso não é tudo. A dose de células CD34 parece influenciar a incidência da chamada neutropenia secundária (a que ocorre após a recuperação dos neutrófilos); doses mais altas estão associadas a uma menor incidência de neutropenia secundária.

Neste contexto, pode-se supor que a dose de células-tronco hematopoéticas, representada pela dose de células CD34, se reflete na recuperação hematopoética a longo prazo, proporcionando uma reserva medular mais consistente para enfrentar eventuais infecções. Uma outra hipótese, compatível com a primeira, é a de que a recuperação de outras células derivadas da medula óssea (linfócitos e monócitos), também envolvidas em processos infecciosos, poderia ser mais acelerada após o transplante quando houvesse a infusão de doses mais elevadas de células-tronco hematopoéticas. Essa dose mais alta propor-

cionaria uma reconstituição imunológica mais precoce e, por conseqüência, uma menor incidência de episódios infecciosos, resultando em menor taxa de óbito relacionada ao transplante e melhor sobrevida global.

No presente trabalho, estudaremos a recuperação das diversas linhagens hematopoéticas (neutrófilos, plaquetas, eritrócitos, monócitos e linfócitos) bem como a incidência de episódios de neutropenia secundária, assim como verificaremos a incidência dos diversos episódios infecciosos graves (virais, bacterianos e fúngicos) e procuraremos a correlação entre esses diversos desfechos com a dose de células CD34 recebidas no momento do transplante. Finalmente, verificaremos se a dose de células CD34 influencia a mortalidade relacionada ao procedimento, a incidência da DECH e a sobrevida global. Desta maneira, poderemos comprovar nossa hipótese sobre a influência da dose de células CD34 sobre a recuperação hematopoética/imunológica, sua correlação com a incidência de infecções e seu impacto sobre o desfecho principal do transplante, a mortalidade.

## **4 – BIBLIOGRAFIA**

---

## 4 - BIBLIOGRAFIA

---

Amigo ML, del Canizo MC, Caballero MD et al. Factors that influence long-term hematopoietic function following autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 24: 289-293.

Anasetti C, Heimfeld S, Rowley S, et al. Higher CD34 cell dose is associated with improved survival after marrow transplantation from unrelated donors [abstract]. *Blood.*, 1999; 94: 561a.

Anderlini P, Korbling M, Dale D, Gratwohl A, Schmitz N, Stroncek D, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors. *Blood.*, 1997; 90(3):903-8.

Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 1994; 330: 827-38.

Aversa F, Tabilio A, Velardi A et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *NEJM*, 1998; 339: 1186-1193

Bacigalupo A, Piaggio G, Podesta M, Figari O, Benvenuto F, Sogno G et al. Influence of marrow CFU-GM content on engraftment and survival after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 1995; 15: 221-226.

Baech J e Johnsen HE. Technical aspects and clinical impact of hematopoietic progenitor subset quantification. *Stem Cell*, 2000; 18: 76-86.

Bahçeci E, Read EJ, Leitman S et al. CD34+ cell dose predicts relapse and survival after T-cell-depleted HLA-identical haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2000; 108: 408-414.



Barrett AJ, Rindgen O, Zhang M-J, et al. Effect of nucleated marrow cell dose on relapse and survival in identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Blood*. 2000; 95: 3323-3327.

Bearman SI. The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after marrow transplantation. *Blood*, 1995; 85: 3005-3020.

Bearman SI. Venocclusive disease of the liver. *Current opinion in oncology* 2000. 12: 103-109

Beelen DW, Ottinger HD, Elmaagacli A, Scheulen B, Basu O, Kremens B, et al. Transplantation of filgrastim-mobilized peripheral blood stem cells from HLA-identical sibling or alternative family donors in patients with hematologic malignancies: a prospective comparison on clinical outcome, immune reconstitution, and hematopoietic chimerism. *Blood*, 1997; 90(12): 4725-4735.

Beguin Y, Oris R, Fillet G. Dynamics of erythropoietic recovery following bone marrow transplantation: role of marrow proliferative capacity and erythropoietin production in autologous versus allogeneic transplants. *Bone Marrow Transplant.*, 1993;11(4): 285-92.

Behringer D, Bertz H, Schmoor C, Berger C, Dwenger A, Finke J. Quantitative lymphocyte subset reconstitution after allogeneic hematopoietic transplantation from matched related donors with CD34+ selected PBPC grafts unselected PBPC grafts or BM grafts. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 24(3): 295-302.

Bensing W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *Journal of Clinical Oncology*, 1995; 13: 2547-2555.

Billingham RE. The immunology of graft versus host reactions. *Harvey lectures*, 62: 21-78,, 1966.

Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA.. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood*, 1996;, 1988: 4063.

Boeckh MJ et Ljungman P. Cytomegalovirus infection after BMT. In Bowden RA, Ljungman P et Paya CV. *Transplant Infection*, 1998, Lippincott-raven Publishers.

Byrne JL, Stainer C, Cull G, Haynes AP, Bessell EM, Hale G, et al. The effect of the serotherapy regimen used and the marrow cell dose received on rejection, graft-versus-host disease and outcome following unrelated donor bone marrow transplantation for leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:411.

Carlens S, Ringden O, Remberger M, Lonnqvist B, Hagglund H, Klaesson S, et al. Risk factors for chronic graft versus host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant*, 1998; 22: 755-761.

Clift RA, Buckner CD, Thomas ED, Bensinger WI, Bowden R, Bryant E, et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide. *Blood*, 1994; 84: 2036-2043.

Cottler-Fox M. Hematopoietic progenitor stem cells. In Burt RK, Deeg J, Lothian ST. *Bone Marrow Transplantation*, 1998, Landes Bioscience.

Crawford SW and Hackman RC. Clinical course of idiopathic pneumonia after bone marrow transplantation. *Am Rev Respir Dis*, 1993. 147: 1393-1400.

Denning DW. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 1996; 23: 608.

Drenou B. Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts. *Hematol Cell Ther*, 1996; 38: 505.

Elting LS, Bodey GP, Keefe BH. Septicemia and shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. *Clin Infect Dis*, 1992. 14: 1201-1207.

Ferrara J, Levy R et Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft versus host disease. *Biol Blood Marrow Transpl*, 1999; 5: 347.

Flomenberg P, Babbitt J, Drobyski WR, Ash RC, Carrigan DR, Sedmak GV, et al. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis*, 1994; 169: 775-781.

Gianni AM, Bregni M, Siena S, Villa S, Sciorelli GA, Ravagnani F et al. Rapid and complete hemopoietic reconstitution following combined transplantation of autologous blood and bone marrow cells: a changing role for high dose chemo-radiotherapy? *Hematol Oncol*, 1989; 7(2): 139-148.

Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondon G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood*, 1997; 89: 4531-4536.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.*, 1989;321(17):1174-8.

Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*, 1997; 337: 373-81.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, 1974; 18: 295-304.

Goodrich JM, Reed EC, Mori M, Fisher LD, Skerrett S, Dandliker PS, et al. Clinical features and analysis of risk factors for invasive *Candida* infection after bone marrow transplantation. *J Infect Dis*, 1991; 164: 731-740.

Gratwohl A, Hermans J. Outcome of blood and marrow transplants. In: Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl A, Craddock C. *Blood and Bone Marrow Transplantation. The EBMT Handbook*. European School of Haematology 2000.

Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Blood and marrow transplantation activity in Europe, 1997. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant., 1999;24:231-45.

Haddad E, Landais P, Friedrich W, Gerritsen B, Cavazzana-Calvo M, Morgan G, et al. Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: A european retrospective study. Blood, 1998; 91: 3646-53.

Hagglund H, Ringden O, Remberger M, Lonnqvist B, Sparrelid E, Tammik L, Kumlien G. Faster neutrophil and platelet engraftment, but no differences in acute GVHD or survival, using peripheral blood stem cells from related and unrelated donors, compared to bone marrow. Bone Marrow Transplant, 1998;22(2):131.

Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, Appelbaum F, Chauncey TR, Clift RA, et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. N Engl J Med., 1998;338(14):962-8.

Hassan HT, Krog C, Stockschrader M, Zeller W, Kruger W, Erttmann R, et al. Factors influencing haematological recovery after allogeneic bone marrow transplantation in leukaemia patients treated with methotrexate-containing GVHD prophylaxis. Support Care Cancer, 1997; 5: 299-306.

Holler E, Kolb HJ, Moller A, Kempeni J, Liesenfeld S, Pechumer H, et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. Blood, 1990; 75: 1011-16.

Hongeng S, Krance RA, Bowman LC, Srivastava DK, Cunningham JM, Horwitz EM, et al. Outcomes of transplantation with matched-sibling and unrelated donor bone marrow in children with leukaemia. Lancet, 1997; 350: 767-771.

Howard DS, Phillips II GL, Reece DE, Munn RK, Henslee-Downey J, Pittard M, et al. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis, 1999. 29: 1494-1501.

Ilhan O, Arslan O, Arat M, Beksaç M, Akan H, Ozcan M, et al. The impact of the CD34+ cell dose on engraftment in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion Science*, 1999; 20: 69-71.

Jantunen E, Piilonen A, Volin L, Parkkali T, Koukila-Kahkola P, Ruutu T, et al. Diagnosis aspects of invasive *Aspergillus* infections in allogeneic BMT recipients. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:867-871.

Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ. Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol.*, 1985 Dec;61(4):739-45.

Kalhs P, Panzer S, Kletter K, Minar E, Stain-Kos M, Walter R, et al. Functional asplenia after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med*, 1988; 109: 461-464.

Kantrow SP, Hackman RC, Boeckh M, Myerson D, Crawford SW. Idiopathic pneumonia syndrome: changing spectrum of lung injury after marrow transplantation. *Transplantation*, 1997. 63:107-1086.

Ketterer N, Salles G, Raba M, Espinouse D, Sonet A, Tremisi P, et al. High CD34+ cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood*, 1998; 91: 3148-3155.

Kiss JE, Rybka WB, Winkelstein A, deMagalhaes-Silverman M, Lister J, D'Andrea P, et al. Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1997; 19: 303-310.

Klumpp TR, Goldberg SL, Magdalinski AJ, Mangan KF. Phase II study of high-dose cyclophosphamide, etoposide and carboplatin (CEC) followed by autologous hematopoietic stem cell rescue in women with metastatic or high-risk non-metastatic breast cancer: Multivariate analysis of factors affecting survival and engraftment. *Bone Marrow Transplantation*, 1997; 20: 273-281.

Kolbe K, Domkin D, Derigs HG, Bhakdi S, Huber C, Aulitzky WE. Infectious complications during neutropenia subsequent to peripheral blood stem cell transplantation. *BMT*, 1997., 19: 143-147.

Korbling M, Huh YO, Durett A, Mirza N, Miller P, Engel H, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease *Blood*, 1995; 86: 2842-8.

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS.. CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood*, 1996; 87: 1-13.

Kruger W, Russmann B, Kroger N, Salomon C, Ekopf N, Elsner HA, et al. Early infections in patients undergoing bone marrow or blood stem cell transplantation - a 7 year single centre investigation on 409 cases. *Bone Marrow Transplant*, 1999; 23: 589-597.

Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, et al. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. *Blood*, 1999; 93: 3662-3671.

Lossos IS, Breuer R, Or R, Strauss N, Elishoov H, Naparstek E, et al. Bacterial pneumonia in recipients of bone marrow transplantation. *Transplantation.*, 1995; 60: 672-678.

Ljungman P. Infection, In: Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl A, Craddock C. *Blood and Bone Marrow Transplantation. The EBMT Handbook. European School of Haematology* 2000.

Manteiga R, Martino R, Sureda A. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided pre-emptive treatment with ganciclovir after allogeneic stem transplantation: A single-center experience. *Bone Marrow Transplant*, 1998; 22: 899-904.

Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, et al T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*, 1991; 78(8):2120-30.

Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: Evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J Infect Dis* 2000. 181: 309-316.

Martin PJ. Prevention of allogeneic marrow graft rejection by donor T cells that do not recognize recipient alloantigens: potential role of a veto mechanism. *Blood.*, 1996; 88(3):962-9.

Martino R, Bretagne S, Rovira M, Ullmann AJ, Maertens J, Held T, et al. Toxoplasmosis after hematopoietic stem transplantation. Report of a 5-year survey from the Infectious Disease Working Party of the European group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 1111-1114.

Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Hematopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone marrow transplantation. *Br Med J.*, 1963;2:1633-1635.

Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, et al. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood.*, 1996; 88: 3223-3229.

McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman HM, Thomas ED. Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors. *Hepatology*, 1984. 4:116-122.

Mehta J, Powles R, Singhal S, Horton C, Middleton G, Eisen T, et al. Early identification of patients at risk of death due to infections, hemorrhage, or graft failure after allogeneic bone marrow transplantation on the basis of the leukocyte counts. *Bone Marrow Transplant.*, 1997A; 19: 349-355.

Mehta J, Powles R, Treleaven J, Horton C, Tait D, Meller S, et al. Long-term follow-up of patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in first remission after cyclophosphamide-total body irradiation and cyclosporine. *Bone Marrow Transplantation*, 1996; 18: 741-746.

Mehta J, Powles R, Treleaven J, Kulkarni S, Horton C, Singhal S. Number of nucleated cells during allogeneic and autologous bone marrow transplantation: an important modifiable factor influencing outcome. *Blood*, 1997B; 90: 3808-3810.

Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis*, 1986; 153: 478-488.

Morariu-Zamfir R, Rocha V, Devergie A, Socie G, Ribaud P, Esperou H, et al. 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.

Morrison VA, Haake RJ, Weisdorf DJ. Non-Candida fungal infections after bone marrow transplantation: Risk factors and outcome. *Am J Med*, 1994. 96: 497-503.

Mullen CA, Nair J, Sandesh S, Chan KW. Fever and neutropenia in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *BMT 2000*. 25: 59-65.

Nash RA, Pepe MS, Storb R, Longton G, Pettinger M, Anasetti C, et al Acute graft versus host disease: Analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporin and methotrexate. *Blood*, 1992; 80: 1838-1845.

Niederwieser D, Pepe M, Storb R, Loughran, Jr. TP, Longton G. Improvement in rejection, engraftment rate and survival without increase in graft-versus-host disease by high marrow cell dose in patients transplanted for aplastic anaemia. *B J Haematol.*, 1988; 69: 23-28.

Parkman R, Weinberg KI. Immunological reconstitution following bone marrow transplantation. *Immunol Rev.*, 1997;157:73-8.

Pavletic ZS, Bishop MR, Tarantolo SR, Martin-Algarra S, Bierman PJ, Vose JM, et al. Hematopoietic recovery after allogeneic blood stem-cell transplantation compared with bone marrow transplantation in patients with hematopoietic malignancies. *J Clin Oncol.*, 1997; 15: 1608-1616.



Perez-Simon JA, Martin A, Caballero D, Corral M, Nieto MJ, Gonzalez M, et al. Clinical significance of CD34+ cell dose in long-term engraftment following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 24: 1279-1283.

Pirsch JD, Maki DG. Infectious complications in adults with bone marrow transplantation and T-cell depletion of donor marrow. *Ann Intern Med*, 1986; 104: 619-631.

Pizzo PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. *NEJM*, 1993. 328(18): 1323-1332.

Powles R, Mehta J, Kulkarni S, Treleaven J, Millar B, Marsden J, et al. Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. *Lancet*. 2000; 355(9211):1231-7.

Powles R, Singhal S, Treleaven J, Kulkarni S, Horton C, Mehta J. Identification of patients who may benefit from prophylactic immunotherapy after bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia on the basis of lymphocyte recovery early after transplantation. *Blood*, 1998; 91: 3481-3486.

Prentice HG, Gluckman E, Powles RL, Ljungman P, Milpied NJ, Camara R, et al. Long-term survival in allogeneic bone marrow transplant recipients following acyclovir prophylaxis for CMV infections. *Bone Marrow Transplant*, 1997; 19: 129-133.

Reis MD. Enumeration of CD34+ hematopoietic precursor cell: Current status. *Transplantation Proceedings*, 1999; 31: 2970-2972.

Ribaud P, Chastang C, Latge JP, Baffroy-Lafitte L, Parquet N, Devergie A, et al. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.*, 1999; 28: 322-330.

Ribaud P. Early complications, In: Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl A, Craddock C. *Blood and Bone Marrow Transplantation. The EBMT Handbook. European School of Haematology 2000.*

Richardson MD, Kokki MH. Diagnosis and prevention of fungal infection in the immunocompromised host. *Blood Reviews*, 1998; 12: 241-54.

Ringdén O, Remberger M, Runde V, Bornhäuser M, Blau IW, Basara N, et al. Peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors: A comparison with marrow transplantation. *Blood*, 1999; 94: 455-464.

Rizzoli V, Carlo-Stella C. Stem cell manipulation: Why and how performing peripheral blood progenitor cell purging. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 1997; 26: 101-115.

Rocha V, Carmagnat M-V, Chevret S, Flinois O, Bittencourt H, Esperou H, et al. Influence of bone marrow graft lymphocyte subset on the outcome of HLA identical sibling transplants. *Experimental Hematology* 2001; 29: 1347-1352.

Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft versus host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. *NEJM* 2000; 342: 1846-1854.

Russell JA, Larratt L, Brown C, Turner AR, Chaudhry A, Booth K, et al. Allogeneic blood stem cell and bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplasia: influence of stem cell source on outcome. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 24: 1177-1183.

Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med.*, 1983; 309(22):1347-53.

Sayer HG, Longton G, Bowden R, Pepe M, Storb R. Increased risk of infection in marrow transplant patients receiving methylprednisolone for graft versus host disease prevention. *Blood*, 1994; 84: 1328-1332.

Schmitz N, Bacigalupo A, Hasenclever D, Nagler A, Gluckman E, Clark P, et al. Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukaemia: first results of a randomised multicentre trial of the European Group for Blood and Marrow. *Bone Marrow Transplant.*, 1998 May;21(10):995-1003.

Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH. Effect of CD34+cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol.*, 1999; 17: 1227-1233.

Shingal S, Powles R, Treleaven J, Kulkarni S, Sirohi B, Horton C, et al. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should  $2 \times 10^6$ /kg CD34+ cells be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplantation* 2000; 26: 489-496.

Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man: A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med.*, 1980; 69: 204-217

Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34+ cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2000; 18(6): 1360-1377.

Sierra J, Storer B, Hansen JA, Bjerke JW, Martin PJ, Petersdorf EW, et al. Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: The effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood.*, 1997; 89: 4226-4235.

Sierra J, Storer B, Hansen JA, Martin PJ, Petersdorf EW, Woolfrey A et al. Unrelated donor marrow transplantation for acute myeloid leukemia: An update of the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 397-404.

Singhal S, Powles R, Treleaven J, Kulkarni S, Sirohi B, Horton C, et al. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should  $2 \times 10^6$  CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26(5):489-96.

Slavin S, Or R, Naparstek E, Ackerstein A, Weiss L. Cellular mediated immunotherapy of leukemia in conjunction with autologous and allogeneic bone marrow transplantation in experimental animals and man [abstract]. *Blood*, 1988; 72: 407a.

Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, Black P, Castro-Malaspina H, Childs BH, et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood.*, 1999; 93(2):467-80.

Socie G, Cahn JY. Acute graft versus host disease in Barrett J et Treleaven JG. *The clinical practice of stem-cell transplant.*, 1998, Isis Medical Media.

Solano C, Martinez C, Brunet S, Tomas JF, Urbano-Ispizua A, Zuazu J, et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation from matched related donors. A case-control study. Spanish Group of Allo-PBT. *Bone Marrow Transplant.*, 1998; 22(12):1129-35.

Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, et al. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncology* 2001., 19(8): 2201-2205.

Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, et al. Oral Mucositis and the Clinical and Economic Outcomes of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clinical Oncology* 2001., 19(8): 2201-2205.

Sparrelid E, Hägglund H, Remberger M, Ringdén O, Lönnqvist B, Ljungman P, et al. Bacteremia during the aplastic phase after allogeneic bone marrow transplantation is associated with early death from invasive fungal infection. *Bone Marrow Transplant*, 1999. 22: 795-800.

Steer CB, Szer J, Sasadeusz J, Matthews JP, Beresford JA, Grigg A. Varicella-zoster infection after allogeneic bone marrow transplantation: incidence, risk factors and prevention with low-dose aciclovir and ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:657-664.

Storb R, Prentice RL, Thomas ED. Marrow transplantation for treatment of aplastic anemia. An analysis of factors associated with graft rejection. *N Engl J Med.* 1977; 296: 61-6.

Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood.* 2001;97(11):3380-9.

Storek J, Gooley T, Siadak M, Bensinger WI, Maloney DG, Chauncey TR, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high increase of chronic graft versus host disease. *Blood,* 1997; 90: 4705-4709.

Takenaka K, Gondo H, Tanimoto K, Nagafuji K, Fujisaki T, Mizuno S, et al Increased risk of CMV infection and CMV-associated disease after allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant,* 1997;, 19: 241-246.

Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med.*, 1975; 292: 832-843, 895-902.

Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.*, 1999;105(2):330-9.

Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, et al. Analysis of engraftment, graft versus host disease and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000; 96: 2703-2711.

To LB, Haylock DN, Simmons PJ e Juttner CA. The biology and clinical use of blood stem cells. *Blood,* 1997; 89: 2233-2258.

Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, Solano C, de la Rubia J, Brunet S, et al. The number of donor CD3+ cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood.* 2001; 97: 383-387.

Van Burik JH, Weisdorf DJ. Infections in recipients of blood and marrow transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am,* 1999. 13(5): 1065-1089.

van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Schellekens PT, van den Bergh RL, Waaijer JL, et al. Relationship between patterns of engraftment in peripheral blood and immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation for (severe) combined immunodeficiency. *Blood.*, 1994; 84(11):3936-47.

Vannucchi AM, Bosi A, Linari S, Guidi S, Longo G, Lombardini L, et al. High doses of recombinant human erythropoietin fail to accelerate platelet reconstitution in allogeneic bone marrow transplantation. Results of a pilot study. *Haematologica.*, 1997; 82(1):53-6.

Vasconcelles MJ, Bernardo MV, King C, Weller EA, Antin JH. Aerosolized pentamidine as pneumocystis prophylaxis after bone marrow transplantation is inferior to other regimens and is associated with decreased survival and an increased risk of other infections. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6:35-43.

Vigorito AC, Azevedo WM, Marques JF, Azevedo AM, Eid KA, Aranha FJ, et al. A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.*, 1998; 22(12):1145-51.

Vogelsang GB. How I treat chronic graft versus host disease. *Blood* 2001; 97: 1196-1201.

Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, West W. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collection in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood*, 1995; 86: 3961-3969.

Weaver CH, Potz J, Redmond J, Tauer K, Schwartzberg LS, Kaywin P, et al. Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34+ cell content. *Bone Marrow Transplant*, 1997; 19: 1103-10.

Williamson EC, Millar MR, Steward CG, Cornish JM, Foot AB, Oakhill A, et al. Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *B J Hematol*, 1999; 104:560-568.

Wingard JR. Fungal infections after bone marrow transplant. *Biol Blood Marrow Transplant.*, 1999; 5: 55-68.

Yu C, Storb R, Mathey B, Deeg HJ, Schuening FG, Graham TC, et al. DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: effects of high-dose corticosteroids and cyclosporine on engraftment *Blood*, 1995. 86:4376-4381.

Yuen KY, Woo PC, Hui CH, Luk WK, Chen FE, Lie AK, et al. Unique risk factors for bacteraemia in allogeneic bone marrow transplant recipients before and after engraftment. *Bone Marrow Transplant*, 1998; 21: 1137-1143.

**5 - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA  
REVISTA BLOOD**

---



## 5 - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BLOOD

### ASSOCIATION OF CD34 CELL DOSE WITH HEMATOPOIETIC RECOVERY, INFECTIONS AND OTHER OUTCOMES AFTER HLA IDENTICAL SIBLING BONE MARROW TRANSPLANT

**Short Title:** CD34+ cell dose on HLA-identical sibling BMT.

**Scientific Section Heading:** Clinical Observation, Intervention, & Therapeutic Trials

**Authors:** Henrique Bittencourt, Vanderson Rocha, Sylvie Chevret, Gérard Socié, Hélène Espérou, Agnès Devergie, Liliane Dal Cortivo, Jean-Pierre Marolleau, Federico Garnier, Patricia Ribaud and Eliane Gluckman.

**Name of institutions:** Bone Marrow Transplant Unit, Cell Therapy Laboratory and Biostatistics  
Unit, Hospital Saint-Louis, Paris, France

**Corresponding author:**

Eliane Gluckman, MD

Service d'Hématologie-Greffe de Moelle, Hôpital Saint-Louis

1, avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, FRANCE

Phone number: + 33 (1) 42 49 96 44

Fax number: + 33 (1) 42 49 96 34

e-mail address: [eliane.gluckman@sls.ap-hop-paris.fr](mailto:eliane.gluckman@sls.ap-hop-paris.fr)

Word counts - Whole text/Abstract: 4317/246

## ABSTRACT

While CD34 cell dose is known to influence outcome of peripheral stem cell and/or T-cell depleted transplantation, such data on unmanipulated marrow transplantation are scarce. In order to study the influence of CD34+ cell dose on hematopoietic reconstitution and incidence of infections after bone marrow transplant (BMT), we retrospectively analyzed 212 patients transplanted from 01/94 to 08/99 with an unmanipulated graft from an HLA-identical sibling donor. Median age was 31 years, 176 patients had hematologic malignancies. Acute graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis consisted mainly in cyclosporin associated with methotrexate (n = 174). Median number of bone marrow nucleated cells (NC) and CD34+ cells infused were  $2.4 \times 10^8/\text{kg}$  and  $3.7 \times 10^6/\text{kg}$ , respectively. A CD34+ cell dose  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  significantly influenced neutrophil (Hazard Ratio, HR = 1.37, P = 0.04), monocyte (HR = 1.47, P = 0.02), lymphocyte (HR = 1.70, P=0.003), erythrocyte (HR = 1.77, P = 0.0002) and platelet (HR = 1.98, P = 0.00008) recoveries. CD34+ cell dose also influenced the incidence of secondary neutropenia (HR = 0.60, P = 0.05). Bacterial and viral infections were not influenced by CD34 cell dose, whereas it influenced the incidence of fungal infections (HR = 0.41, P = 0.008). Estimated 180-day transplant-related mortality (TRM) and 5-year survival were 25% and 56%, respectively, and both were highly affected by CD34+ cell dose (HR = 0.55, P = 0.006 and HR = 0.54, P = 0.03, respectively). Five-year survival and 180-day TRM were respectively, 64% and, 19% for patients receiving a CD34+ cell dose  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  and 37% and 40% for the remainders. In conclusion a CD34+ cell dose  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  improved all hematopoietic recoveries, decreased the incidence of fungal infections and TRM, and improved overall survival.

**Key words:** CD34 cell dose, allogeneic bone marrow transplant, hematopoietic recovery

## INTRODUCTION

Allogeneic bone marrow transplantation (BMT) has been widely used to treat different types of malignant and non-malignant hematological disorders as well as congenital metabolic and immunodeficiency diseases. Although peripheral blood stem cells (PBSC) have been increasingly used since 1994, bone marrow (BM) remains the main source of allogeneic hematopoietic stem cells (1). Patient –, disease – and transplant-related factors (such as age, disease status, type of donor, etc.) have been extensively studied and have shown significant influence on outcome after BMT. It has been realized that the total number of nucleated cells infused is a significant prognostic factor after allogeneic stem cell transplant for different outcomes: a low dose of nucleated cells has been associated with an increased risk of rejection (2, 3), with a slower engraftment rate (3), an increased transplant related mortality (TRM) (4, 5, 6), and a lower disease-free survival (4, 5, 6, 7), independently of the type of donor (related or unrelated) and the source of stem cell transplanted (bone marrow, peripheral stem cell or cord blood cells) (8, 9).

CD34 designates a surface membrane molecule present in all committed and non-committed hematopoietic progenitor cells and has been used as a surrogate marker of the hematopoietic stem cell content mainly in mobilized peripheral stem cell (autologous or allogeneic) (10, 11, 12, 13) and in bone marrow (14, 15, 16, 17) transplants. Studies dealing with allogeneic stem cell transplantation have already showed that CD34+ cell dose is a significant prognostic factor for survival and TRM. However, the reason of such influence is not clear since it seems that neutrophil recovery is not influenced by CD34+ cell dose in the allogeneic BMT setting (14, 18). In order to understand why CD34+ cell dose has an impact on TRM and survival after allogeneic BMT, we addressed the question whether a better recovery of other parameters of hematopoietic reconstitution (i.e., secondary neutropenia,

and recovery of monocytes, lymphocytes, erythrocytes and platelets) as well as its impact on infections could explain a decreased TRM and better survival after BMT.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patient, Donor and Transplant Characteristics**

Between January 1<sup>st</sup> 1994 and August 31<sup>st</sup> 1999, a total of 214 consecutive patients underwent a HLA-identical sibling BMT at the bone marrow transplant unit of Hôpital Saint Louis, Paris, France. Two patients were excluded because of insufficient data collected (n = 1) and absence of CD34+ quantification (n = 1). Table 1 summarizes the patient, disease and transplant characteristics of the 212 analyzed patients.

### **Graft Versus Host Disease (GVHD) Prophylaxis, Conditioning Regimen and Supportive Therapy**

Prophylaxis for acute GVHD consisted of the standard combination of cyclosporine (CSA) and methotrexate (MTX) in 174 (82.1%) patients. All patients received an unmanipulated BMT.

Conditioning for transplantation varied according to diagnosis. Eighty six (40.6%) patients received an irradiation-containing regimen. Eighty patients received fractionated TBI (12 Gy in 6 fractions over 3 days) and six patients with Fanconi anemia received a specific regimen associating thoraco-abdominal irradiation (TAI) (4.5 Gy single dose) with low dose

cyclophosphamide. One hundred and twenty six (59.4%) patients received a chemotherapy – based conditioning. Twenty four (11.3%) patients with bone marrow failure syndromes received IV anti-thymocyte globulin (ATG) prior to the transplant.

All patients were isolated in laminar air flow rooms. Irradiated and leukocyte depleted blood products were used for all patients. Patients were transfused with red blood cells (RBC) or platelets when hemoglobin was less than 8 g/dL and platelet count was less than  $20 \times 10^9/L$  respectively. Selective gut decontamination with oral antibiotics and viral/fungal/parasitic prophylaxis were performed according to local policy, that remained constant during the 6 years period of the study. A pre-emptive treatment with ganciclovir or foscarnet for CMV reactivation based on CMV antigenemia screening was used from, 1994. Hematopoietic growth factors (HGF) were not routinely given and only 13 (6.1%) patients received HGF because of the patient's inclusion in a randomized clinical trial, conditioning toxicity, or severe infection.

### **Graft Collection, Manipulation and Stem Cell Content (nucleated Cells and CD34) Quantification**

Bone marrow was harvested from both posterior iliac crests, under general anesthesia. Marrow was aspirated with plastic syringes in aliquots of 2 to 10 ml and diluted with heparinized tissue culture medium RPMI 1640 (for BM collected between 1994 and 1995) or acid-citrate dextrose (ACD) (for collections between, 1995 and, 1999). Routine processing of BM consisted in the preparation of a buffy-coat, by centrifugation on Cobe 2991 at 3000 rounds per minute for 5 minutes. Buffy-coat cells were resuspended in human serum albumin and infused to the patient. This method yields approximately 85% of the starting nucleated and CD34+ positive cells, and allows concentration to 10% of the original

volume, by elimination of supernatant and part of erythrocytes. In situations of major donor-recipient ABO-incompatibility, red blood cells were eliminated by centrifugation on Cobe 2991. Briefly, 450 ml of diluted buffy-coat cells, with hematocrit adjusted to < 20%, were layered on 150 ml of Ficoll-Hypaque and centrifuged for 15 minutes at 400 g. After ficoll washing, mononuclear cells were resuspended in human serum albumin and infused to the patient. This process allows recovery of 20% of the initial nucleated cells, of which 75% are mononucleated cells, and of 56% of the CD34+ cells with less than 0.1% of the original red cells.

Automated cell counts and CD34+ cell quantification were performed both before and after processing, but only the latter was taken into account in this study. CD34+ cell quantification was performed as previously described by fluorescence analysis (18). Briefly, one million BM cells at initial and final steps of the procedure were incubated for 10 min at room temperature with 20 µl of HPCA2-PE and anti-CD45-FITC monoclonal antibodies (Becton Dickinson, France). Immunofluorescence analysis was performed using a five parameters FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). The total number of CD34+ cells obtained at the end of processing corresponds to the number infused to the patient.

## Endpoint Definitions and Statistical Analysis

### *Hematopoietic Reconstitution:*

**Neutrophil recovery** was defined as the first of 3 consecutive days with neutrophils more than  $0.5 \times 10^9/L$  during the first 60 days after transplant. **Secondary neutropenia** was defined as neutrophil engraftment followed by a decrease of neutrophils

below  $0.5 \times 10^9/L$  for at least 3 days. **Monocyte recovery** was defined as the first day after transplant with monocyte counts more than  $0.3 \times 10^9/L$  during the first 60 days after transplant. **Lymphocyte recovery** was defined as the first day with lymphocyte counts more than  $0.5 \times 10^9/L$  during the first 180 days after transplant. **Platelet recovery** was defined as the first of seven days of unsupported platelets more than  $20 \times 10^9/L$  during the first 180 days after transplant. **Erythrocyte recovery** was defined as the first of ten days of unsupported hemoglobin more than 8g/dL during the first 100 days after transplant.

### *Infections Definitions*

The date of the first episode of severe bacterial, viral and invasive fungal infections of each patient were analyzed. We included cytomegalovirus infection in the severe viral infection group for statistical purpose. Definitions are listed below.

### Severe Viral Infections

**Cytomegalovirus (CMV) disease** was diagnosed according to previous published criteria(19). **Herpes simplex virus (HSV) infection** was defined as a respiratory, digestive or neurological disease with isolation of HSV virus in culture. **Adenovirus infection** was diagnosed if adenovirus was present in one site whatever technique was used, except immunohistochemistry on biopsy. Probable Adenovirus disease was defined as presence of adenovirus in two or more sites whatever technique, except immunohistochemistry on biopsy and definitive Adenovirus disease as histochemistry on biopsy or positive culture from biopsy (except GI) or positive CSF sample. **Other viral infections** were considered as severe when

a virus was isolated from the site of disease and necessity of anti viral treatment. **CMV infection** was defined by a positive antigenemia (presence of 2 or more positive nuclei per 200,000 leukocytes).

## Severe Bacterial Infections

We considered severe bacterial infections when sepsis, pneumonia and/or septic shock were diagnosed according to previous published criteria (20, 21). Pneumonia was also diagnosed when clinical/radiological signs of pneumonia improved after empiric antibacterials, but not antifungals in the absence of positive blood and/or bronchoalveolar lavage (BAL) culture.

## Invasive Fungal Infections

**Candidemia** was defined by one or more positive blood culture for *Candida* sp. **Disseminated candidosis** was defined by clinical and/or radiological signs of fungal infection with one or more positive blood culture for *Candida* sp. **Proven invasive aspergillosis** was defined by histo/cytopathology evidence of *Aspergillus* sp. from a needle aspiration or biopsy with evidence of associated damaged tissue or positive culture obtained by a sterile procedure with clinical or radiological signs consistent with infection. We considered clinical and radiological signs of invasive aspergillosis with a positive antigenemia (but without microbiological identification) as a **probable invasive aspergillosis**. **Proven invasive fungal infection** was defined by histo/cytopathology evidence of fungi (other than *Aspergillus* sp.) from a needle aspiration or biopsy with evidence of associated damaged



tissue or positive culture obtained by a sterile procedure with clinical or radiological signs consistent with infection.

### *Other Outcomes*

**Acute and chronic graft versus-host disease** (GVHD) were diagnosed and graded according to published criteria (23, 24, 25). All patients were considered evaluable for acute GVHD (aGVHD) at day +1 after transplant. Occurrence of chronic GVHD (cGVHD) was evaluated among patients who survived with sustained engraftment from day +100 after transplant.

**Survival** was calculated from transplantation to death from any cause. **Transplant related mortality** (TRM) was calculated from transplantation to death related to transplant and not to relapse, until day 180.

### **Statistical Analysis**

The reference date of March 1st 2000 was used. Statistical analyses were independently performed for each endpoint, i.e., neutrophil-, monocyte-, lymphocyte-, hemoglobin- and platelet-recoveries, time to secondary neutropenia, and time to bacterial, viral and fungal infection.

Incidences of each event was non parametrically estimated. Then, each prognostic analysis was based on the same procedure as described below. First, univariable regression models were fitted with estimated hazard ratio (HR) and 95 percent confidence interval (95CI). The predictive effect of each of the following variables was assessed:

Recipient and donor ages, recipient and donor genders, recipient weight, recipient and donor CMV serologies, gender match, ABO compatibility, ABO major mismatch, female donor to a male recipient, diagnosis of malignancy, diagnosis of chronic leukemia, diagnosis of acute leukemia, diagnosis of malignancy other than leukemia, advanced stage of disease, use of a radiation-based conditioning, use of busulfan + cyclophosphamide (BuCy), nucleated cell and CD34+ marrow cell doses. CD34+ cell dose ( $3 \times 10^6/\text{Kg}$ ) was introduced after dichotomization according to a cutoff of clinical significance, defined according to a previous publication by the NIH group (16). Multivariable regression models were then fitted in which all covariates previously selected as having prognostic value at the 10 % level were introduced simultaneously with the CD34+ cell dose (Table 2).

Statistical tools used to estimate incidences and to assess the influence of each factor on either outcome, either lonely or jointly, were the Kaplan Meier estimator and the Cox regression model. However, since the recovery of cell subsets or hemoglobin, and the development of infection were events that compete with patient death, estimations of incidence of these events relied on the non parametric estimator of cumulative incidence curves while predictive analyses were based on the proportional hazards model for these subdistribution of competing risks (26).

Correlation between NC and CD34+ cell dose were tested by the Pearson correlation test. The Mann Whitney test was used to compare differences of NC and CD34+ cell dose between ABO match/minor mismatch and ABO major mismatch groups.

All statistical tests were two-sided, with p-values of 0.05 or less indicating statistical significance. Statistical analyses were performed on SAS 8.1 (SAS Inc, Cary, NC) and Splus2000 (MathSoft, Inc, Seattle) software packages.

## RESULTS

### Graft Composition and Infusion

The median dose of NC and CD34+ cells infused was 2.4 (range: 0.28 - 5.97)  $\times 10^8$ /kg and 3.7 (range: 0.07 - 18.7)  $\times 10^6$ /kg, respectively. There was a moderate, although significant, correlation between the number of NC and CD34+ cells infused ( $R = 0.58$ ,  $P < 0.0001$ ). As we concentrated the graft in major ABO incompatibility, median dose of NC/kg was significantly higher in patients with an ABO matched/minor mismatched donor than in patients with an ABO major mismatched donor (2.5 [range: 0.43-5.97]  $\times 10^8$ /kg versus 0.8 [range: 0.28-3.40]  $\times 10^8$ /kg, respectively –  $P < 0.001$ ). The median dose of CD34+ cells/kg was also higher in patients with an ABO matched/ minor mismatched donor than in patients with an ABO major mismatched donor: 3.9 (range: 0.07-18.70)  $\times 10^8$ /kg and 2.9 (range: 0.87-14.00)  $\times 10^8$ /kg, respectively ( $P = 0.03$ ).

### Hematopoietic Recovery

#### *Neutrophil Recovery*

Six patients died during the first 28 days after transplantation without neutrophil recovery and two patients had non-engraftment. Two hundred and four (96.2%) patients achieved an absolute neutrophil count (ANC)  $> 0.5 \times 10^9$ /L. The cumulative incidence rate of recovery at day 60 was 96.2 % overall, with specific incidence of 97.1% in patients receiving  $\geq 3 \times 10^6$ /kg CD34+ cells and 93.1% in patients receiving  $< 3 \times 10^6$ /kg CD34+ cells (Figure 1A).

Results of multivariable analysis (Table 3) showed that infusion of more than  $3 \times 10^6$  /kg CD34+ (HR = 1.37, 95CI = 1.01-1.85, P = 0.04) was associated with faster neutrophil engraftment.

### *Secondary Neutropenia*

Neutropenia of less than  $0.5 \times 10^9$  neutrophil/L after initial engraftment was found in 54 (25.5%) patients, with a cumulative estimated rate at day 180 of 25.6%. The incidence of secondary neutropenia was lower in patients receiving a CD34+ cell dose  $\geq 3 \times 10^6$ /kg than in patients receiving  $< 3 \times 10^6$ /kg (21.6% versus 33.3%, P = 0.07 – Figure 1B). In multivariable analysis a CD34+ cell dose of at least  $3 \times 10^6$ /kg (HR = 0.60, 95CI = 0.35 - 1.02, P = 0.05) was associated with a lower incidence of secondary neutropenia.

### *Monocyte Recovery*

A total of 169 (79.7%) patients achieved monocyte recovery, with an estimated rate of 79.2% at day 60. The 60-days cumulative estimated rate of monocyte recovery in patients receiving CD34+ cell dose  $\geq 3 \times 10^6$ /kg was 82.0% versus 74.0% in those receiving less (P = 0.004 – Figure 1C). Multivariable analysis (Table 3) showed that a CD34+ cell dose higher than  $3 \times 10^6$ /kg (HR = 1.47, 95CI = 1.07 to 2.03, P = 0.02) was associated with faster monocyte recovery.

### *Lymphocyte Recovery*

At day 180, the cumulative estimate rate of lymphocyte recovery was 75.9%, with 161 (75.9%) patients achieving a lymphocyte count  $\geq 0.5 \times 10^9/L$ . The time to lymphocyte recovery was significantly faster for patients receiving  $\geq 3 \times 10^6/kg$  CD34+ cells (i.e., 82.0%) than for those receiving less (64.4%;  $P = 0.0003$ ) (Figure 1D). In univariable analyses, age and recipient's weight, diagnosis of chronic or acute leukemia, donor age, nucleated cell dose superior to  $2.4 \times 10^8/kg$  and CD34+ cell dose higher than  $3 \times 10^6/kg$  significantly affected lymphocyte recovery. In multivariable analysis (table 2), CD34+ cell dose higher than  $3 \times 10^6/kg$  (HR = 1.70, 95CI = 1.20 to 2.41,  $P=0.003$ ) was retained as positively associated with the outcome, jointly with donor age and positive CMV serology.

### *Erythrocyte Recovery*

The cumulative estimated incidence of hemoglobin recovery by day 100 was 84.9%. Time to hemoglobin  $\geq 8$  g/dL in patients receiving a CD34+ cell dose of at least  $3 \times 10^6/kg$  was significantly faster than in remainders (89.2% vs. 76.7%, respectively;  $P = 0.001$  – Figure 1E). Results of multivariable analysis showed that CD34+ cell dose higher than  $3 \times 10^6/kg$  (HR = 1.77, 95CI = 1.31 -2.39,  $P = 0.0002$ ) was associated with faster hemoglobin recovery (table 3).

## *Platelet Recovery*

Cumulative estimated incidence of platelet recovery by day 180 was 79.7%. Cumulative estimated rate of platelet recovery was 86.3% versus 67.1% in patients receiving more or less than  $3 \times 10^6/\text{kg}$  CD34+ cells, respectively (Figure 1F). Female recipient ( $p = 0.025$ ), nucleated cell dose of more than  $2.4 \times 10^8/\text{kg}$  ( $p = 0.017$ ) and a CD34+ cell dose of more than  $3 \times 10^6/\text{kg}$  ( $p = 0.0006$ ) were significantly associated with a faster platelet engraftment in univariable analyses. On the other hand, a diagnosis of malignancy ( $p = 0.10$ ), and an advanced stage of disease ( $p = 0.023$ ) were associated with slower platelet engraftment. Applying a multivariable model (table 3), the most favorable factors affecting platelet engraftment was infusion of a CD34+ cell dose  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  (HR = 1.98, 95CI = 1.41 - 2.77,  $P = 0.00008$ ).

## **Infections**

At day 180 after transplantation, 133 (62.7%) patients had presented at least one episode of microbiologically and/or clinically documented severe bacterial, viral or fungal infection. Infection was directly responsible for 39 (52.0%) of 75 transplant-related deaths in the whole period of follow up. The cumulative incidence rate of infected patients by day 180 was 62.7%.

A bacterial episode of infection occurred in 60 (28.3%) patients. Cumulative incidence of patients with at least one bacterial infection was 28.4% at day 180. Similarly, the cumulative incidence of patients who experienced at least one viral infection was 42.0% at day 180, with a total of 91 events (mainly CMV infection). CD34+ cell dose did not influence incidence of bacterial or viral infection ( $p = 0.40$  and  $p = 0.26$ , respectively).

The estimated probability of experiencing at least one invasive fungal infection (IFI) at 180 days was 17.0%. Figure 2 showed the difference of incidence of IFI according to the number of CD34+ infused, i.e. 12.2% in patients with a CD34+ cell dose  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  and 26.3% in those with a CD34+ cell dose  $< 3 \times 10^6/\text{kg}$ ;  $p = 0.009$ ). There were 26 aspergillosis (7 microbiologically not proven), 7 candidemia, and 3 other disseminated fungal infections (2 episodes of disseminated candidosis and 1 of disseminated *Malasseria furfur*). In multivariable analysis, a dose of CD34+ cells  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  still decreased the probability of IFI (HR = 0.41, 95CI = 0.21 -0.79, P = 0.008) when adjusting for confounding variables.

## Graft Versus Host Disease

Acute GVHD of grade II or more occurred in 101 (47.6%) patients with a cumulative rate of 49% at day 100. Acute GVHD of grade III or IV developed in 36 (17.0%) patients with an estimated incidence of 17% at day 100. Chronic GVHD developed in 86 (49.1%) 175 patients at risk, of which 42 patients had limited disease and 44 extensive disease. The 5-year cumulative incidence of cGVHD was 54%. CD34+ cell dose did not affect the occurrence of either aGVHD (grade II-IV) (P = 0.84), aGVHD (grade III-IV) (P = 0.48) or cGVHD (P = 0.39).

## Transplant Related Mortality and Survival

Fifty two (24.5%) patients died of transplant-related complications during the first 180-days after transplant. The main causes of TRM were invasive fungal infection (n = 15), GVHD (n = 11), bacterial infection (n = 7) and acute respiratory distress syndrome (n = 7).

Kaplan Meier estimate of 180-day TRM was 37% in patients receiving a CD34+ cell dose lower than  $3 \times 10^6$  and, 19% in remainders (Figure 3). In the Cox multivariable analysis infusion of  $\geq 3 \times 10^6$  CD34+ cells per kg (HR = 0.54, 95CI = 0.32-0.94, P = 0.03) was associated with a reduction in TRM. Mortality related to infection during the first 180-days after transplant was higher among patients receiving less than  $3 \times 10^6$  CD34+ cells (16.4% vs. 8.6% for those receiving a higher dose).

With a median follow up of 3.4 (range: 0.6 - 6.1) years, 121 (57.1%) patients were alive on March 1<sup>st</sup> 2000. Four patients were lost to follow-up. The 5-year estimate of survival for the whole population was 56%. Figure 3 shows survival curves according to infused CD34+ cell dose. Ninety one (42.9%) patients died: 14 (6.6%) after relapse, 75 (35.4%) of transplant-related complications and 2 of other causes. Multivariable analysis showed that a CD34+ cell dose  $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg (HR = 0.55, 95CI = 0.36-0.85, P = 0.006) was associated with a better survival rate.

## DISCUSSION

The importance of CD 34+ cell quantification has been clearly demonstrated in autologous or allogeneic peripheral blood hematopoietic stem cell transplants (10 - 13). Studies of CD34+ cell dose in the setting of allogeneic bone marrow transplantation have been mainly restricted to T-cell depleted related or unmanipulated unrelated bone marrow transplant (BMT). Mavroudis et al were the first to suggest in only 28 patients who received a T-cell depleted bone marrow graft that CD34+ cell dose predicted survival, post transplant morbidity, and rate of hematologic recovery (14). More recently, the same group showed that a CD34+ cell dose superior to  $3 \times 10^6$ /kg correlated with a better survival rate, lower transplant-related mortality and less relapses (16). Beside this study, data on the influence of



CD34+ cell graft content on survival, TRM and platelet recovery has only been reported in unrelated unmanipulated BMT (15). However, in this study, as well as in other (17) no correlation between CD34+ cell dose and neutrophil engraftment has been shown

In our retrospective unicentric cohort study, we were able to show that CD34+ cell dose significantly influenced hematopoietic reconstitution. Indeed, our data confirm and extend previous findings that a higher CD34+ cell dose improves hematopoietic recovery (14).

Most previous studies in allogeneic BM and PBSC transplants failed to show a correlation between CD34+ cell dose and neutrophil engraftment (14, 15, 18, 27, 28). However, we found a significant relation between a dose of bone marrow CD34+ cell dose  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  and faster neutrophil engraftment in agreement with the findings of Singhal et al. (29). Also of importance is our finding that the incidence of secondary neutropenia correlates with CD34+ cell dose. Patients receiving a CD34+ cell dose of less than  $3 \times 10^6/\text{kg}$  had a higher risk of secondary neutropenia. Short term engraftment of neutrophils may be dependent on CD34+ progenitor cells committed to granulocyte lineage, even if other accessory cells, such as T lymphocytes also play a role on engraftment (30, 31). Studies on secondary neutropenia after allogeneic BMT are scarce. Neutropenia occurring after ganciclovir prophylaxis for CMV disease after BMT correlates better with low marrow cellularity at D+21 post-transplant than with other markers of engraftment such as time to neutrophil or platelet engraftment (32). Sierra *et al* have shown that a lower nucleated cell dose correlates with a higher incidence of neutropenia below  $0.5 \times 10^9/\text{L}$  during the initial 15 weeks after transplantation (6). The NIH group showed that a dose of CD34+ cells greater than  $2 \times 10^6/\text{kg}$  was correlated with the needs for significantly less G-CSF to maintain neutrophil counts during ganciclovir treatment (14).

In addition, we demonstrated that faster monocyte recovery occurred with an infused CD34+ cell dose greater than  $3 \times 10^6/\text{kg}$ . Lymphocyte reconstitution was also affected by the CD34+ cell dose. Patients receiving more than  $3 \times 10^6/\text{kg}$  CD34+ cells had a median

time to recovery of total lymphocytes ( $> 0.5 \times 10^9/L$ ) 2 months shorter than patients receiving a lower dose. Recently, we have described in 67 patients that recovery of CD3+, CD8+, and B-cell lymphocyte were influenced by CD34+ cell dose. (33).

Regarding erythrocyte reconstitution, CD34+ cell dose was also correlated with faster hemoglobin recovery. Previous studies on autologous PBSC, and also on allogeneic BMT had suggested a lower RBC transfusion requirement and a faster RBC transfusion independence with higher doses of CD34+ cells (14, 34). Platelet recovery also correlates with CD34+ cell dose as previously reported by other groups (11, 14, 15, 17, 27, 35). A more complete and sustained erythrocyte/megakaryocytic reconstitution may be achieved when a higher CD34+ cell dose is used, allowing patients to be transfusion independent earlier.

As previously reported, our data confirm that CD34+ cell dose significantly influences transplant-related mortality and overall survival (14-17). Slower or inadequate immunological recovery is associated with high infection rates after allogeneic BMT. Storek et al have shown that low B-cell and monocyte counts on day 80 were associated with a higher incidence of severe infections (mainly viral and fungal) in allogeneic BMT (36). Secondary neutropenia after ganciclovir prophylaxis for CMV infections was associated with higher rate of bacteremia and fungal infections (32). We hypothesize that, since CD34+ cell dose significantly influences hematopoietic recovery, a faster and more robust immunological recovery occurs with higher doses, and consequently diminishes the risk of infection-related death and TRM. Indeed, this is the first study that described that CD34+ cell dose significantly influenced fungal infection, a rather late event after allogeneic BMT and a leading cause of transplant related mortality (37, 38). Although this clearly warrants further confirmation, this association is of obvious clinical importance. Furthermore, our data showed that monocyte and lymphocyte recovery were faster with higher dose of CD34+ cells. CD34+ cell dose influenced neutrophil-macrophage-monocyte reconstitution which plays an essential role for fungal infections protection (39, 40). As invasive fungal infection occurs later after BMT, secondary neutropenia, rather than early neutrophil engraftment, is an

important risk factor and this might also explain the higher fungal infection rate in patients receiving lower CD34+ cell dose. Finally, the main cause of transplant-associated death was infection (24 out of 53 deaths during the first 180 days after transplant), with a higher infection – associated mortality rate in patients receiving a lower CD34+ cell dose.

One of the advantage of this study is that it comes from a single institution, in which 212 consecutive patients, who underwent allogeneic BMT, had been grafted with the same bone marrow collection technique and treated with the same supportive therapy. CD34+ cell quantification techniques did not change during the duration of the study. A potential disadvantage of our study is that our threshold for CD34+ cell dose might not be useful for other institutions since CD34 quantification may vary between centers. It is known that CD34+ cell quantification is a better surrogate marker for the stem cell content. CFU-GM quantification has been used but is time-consuming and results are only available after two weeks. Nucleated cells dose has been widely used since it is easy to measure and it has been shown to correlate with neutrophil, lymphocyte and platelet recoveries (3, 5, 7). However, little is known about nucleated cell dose and other hematopoietic parameters and long term engraftment. In multivariate analysis, we found that the CD34+ cell dose was a better predictor of hematopoietic recovery. Unfortunately, we did not quantify others cell subsets in the bone marrow graft that could influence outcomes. Of course one question raised with our study is how to increase the CD34+ cell dose? Several ways of achieving this goal can be proposed: G-CSF-stimulated PBSC can provide a higher CD34+ cell graft content compared to steady-state bone marrow (17). Controversy remains regarding the possible higher incidence of chronic GVHD following allogeneic PBSC transplant (41 - 43). Estimation of CD34+ cell dose at the beginning of harvesting, as recently suggested, could be an opportunity to optimize BMT outcomes (44). Use of hematopoietic growth factors (rhuG-CSF or rhuGM-CSF) in selected cases after engraftment could also be an option to be tested.

In conclusion, our results show that HLA-identical related unmanipulated bone marrow CD34+ cell dose higher than  $3 \times 10^6/\text{kg}$  improves hematopoietic recovery and significantly reduces the risk of secondary neutropenia resulting in reduction of fungal infection rate, TRM and consequently improvement of survival.

## BIBLIOGRAPHY

1. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Blood and marrow transplantation activity in Europe, 1997. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.*, 1999;24:231-45.
2. Storb R, Prentice RL, Thomas ED. Marrow transplantation for treatment of aplastic anemia. An analysis of factors associated with graft rejection. *N Engl J Med.*, 1977; 296: 61-6.
3. Niederwieser D, Pepe M, Storb R, Loughran, Jr. TP, Longton G. Improvement in rejection, engraftment rate and survival without increase in graft-versus-host disease by high marrow cell dose in patients transplanted for aplastic anaemia. *B J Haematol.*, 1988; 69: 23-28.
4. Mehta J, Powles R, Singhal S, et al. Early identification of patients at risk of death due to infections, hemorrhage, or graft failure after allogeneic bone marrow transplantation on the basis of the leukocyte counts. *Bone Marrow Transplant.*, 1997;, 19: 349-355.
5. Sierra J, Storer B, Hansen JA, et al. Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: The effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood.*, 1997; 89: 4226-4235.
6. Sierra J, Storer B, Hansen JA, et al. Unrelated donor marrow transplantation for acute myeloid leukemia: An update of the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 397-404.
7. Barrett AJ, Rindgen O, Zhang M-J, et al. Effect of nucleated marrow cell dose on relapse and survival in identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Blood.* 2000; 95: 3323-3327.

8. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med.*, 1997; 337: 373-81.
9. Russell JA, Larratt L, Brown C, et al. Allogeneic blood stem cell and bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplasia: influence of stem cell source on outcome. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 24: 1177-1183.
10. Korbling M, Huh YO, Durett A, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease *Blood.*, 1995; 86: 2842-8.
11. Kiss JE, Rybka WB, Winkelstein A, et al. Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1997;, 19: 303-310.
12. Weaver CH, Potz J, Redmond J, et al. Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34+ cell content. *Bone Marrow Transplant*, 1997;, 19: 1103-10.
13. Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH. Effect of CD34+cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol.*, 1999; 17: 1227-1233.
14. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, et al. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood.*, 1996; 88: 3223-3229.
15. Anasetti C, Heimfeld S, Rowley S, et al. Higher CD34 cell dose is associated with improved survival after marrow transplantation from unrelated donors [abstract]. *Blood.*, 1999; 94: 561a.

16. Bahçeci E, Read EJ, Leitman S, et al. CD34+ cell dose predicts relapse and survival after T-cell-depleted HLA-identical haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2000; 108: 408-414.
17. Singhal S, Powles R, Kulkarni S, et al. Comparison of marrow and blood cell yields from the same donors in a double-blind, randomized study of allogeneic marrow vs. Blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25: 501-505.
18. Morariu-Zamfir R, Rocha V, Devergie A, et al. 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.
19. Ljungman P, Griffiths P. Definitions of cytomegalovirus infection and disease. In: Michelson S, Plotkin SA, eds. *Proceedings of the Fourth International Cytomegalovirus Workshop: Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease.* Paris, France: Elsevier Science Publishers BV,, 1993:233-237.
20. American Society of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.*, 1992; 20: 864-874.
21. Lossos IS, Breuer R, Or R, et al. Bacterial pneumonia in recipients of bone marrow transplantation. *Transplantation.*, 1995; 60: 672-678.
22. Lortholary O, Asciglu S, Moreau P et al. Invasive Aspergillosis as an opportunistic infection in nonallografted patients with multiple myeloma: A European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 41-46.
23. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation,* 1974; 18: 295-304.
24. 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: 204-217.

25. Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients. Adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood.*, 1981; 57: 267-276.
26. Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *JASA*, 1999; 94: 496-509.
27. Pavletic ZS, Bishop MR, Tarantolo SR, et al. Hematopoietic recovery after allogeneic blood stem-cell transplantation compared with bone marrow transplantation in patients with hematopoietic malignancies. *J Clin Oncol.*, 1997; 15: 1608-1616.
28. Lickliter JD, McGlave PB, DeFor TE, et al. Matched-pair analysis of peripheral blood stem cells compared to marrow for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 723-8.
29. Singhal S, Powles R, Treleaven J, Kulkarni S, Sirohi B, Horton C, et al. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should 2x10<sup>6</sup>/kg CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 489-496.
30. Rocha V, Carmagnat M, Chevret S, et al. Influence of bone marrow graft lymphocyte subset on the outcome of HLA identical sibling transplants. *Exp Hematol.* 2001; 29: 1347-1352.
31. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, et al. The number of donor CD3+ cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood.* 2001 97: 383-387.
32. Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, Davis C, Boeckh M. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: Risk factors and outcome. *Blood.*, 1997; 90: 2502-2508.
33. Garnier F, Porcher R, Carmagnat M, et al. Factors influencing lymphocyte subsets recovery after HLA identical sibling bone marrow transplantation (BMT). Role of nucleated and CD34+ cell dose [abstract]. *Blood* 2000; 11: 409a.



34. Pérez-Simón JA, Martín A, Caballero D, et al. Clinical significance of CD34+ cell dose in long-term engraftment following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 24: 1279-1283.
35. Lowenthal RM, Faberes C, Marit G, et al. Factors influencing haemopoietic recovery following chemotherapy-mobilised autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for haematological malignancies: a retrospective analysis of a 10-year single institution experience. *Bone Marrow Transplant.*, 1998;22:763-70.
36. Storek J, Espino G, Dawson MA, Storer B, Flowers ME, Maloney DG. Low B-cell and monocyte counts on day 80 are associated with high infection rates between days 100 and 365 after allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 2000;96:3290-3.
37. Wingard JR. Fungal infections after bone marrow transplant. *Biol Blood Marrow Transplant.*, 1999; 5: 55-68.
38. Ribaud P, Chastang C, Latge JP, et al. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.*, 1999; 28: 322-330.
39. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.*, 1999; 12: 310-350.
40. Mehrad B, Moore TA, Standiford TJ. Macrophage inflammatory protein-1 is a critical mediator of host defense against invasive aspergillosis in neutropenic hosts. *J Immunol.* 2000; 165: 962-968.
41. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2001;344:175-81.
42. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: A report from the Societe Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 537-546.

43. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood*. 2000; 95: 3702-3709.
44. Shaughnessy PJ, Kissack B, Bickford DJ, et al. Correlation of CD34 percentage and volume of bone marrow collected for allogeneic bone marrow harvest [abstract]. *Blood*., 1999; 94: 323a.

## Legend of Tables

**Table 1** - Patients, Disease, Donor and Transplant Characteristics of the 212 enrolled patients

**Table 2** - Variables included in multivariable analysis for each endpoint. These variables were previously selected as having prognostic value at 10% level.

**Table 3** - Multivariable analyses of hematopoietic recovery, fungal infection, transplant-related mortality and overall survival

## Legend of Figures

**Figure 1** - Cumulative incidence of hematopoietic recoveries according to CD34 cell dose: a) neutrophil, b) secondary neutropenia, c) monocyte, d) lymphocyte, e) hemoglobin, and f) platelet recoveries.

**Figure 2** - Cumulative Incidence of Invasive Fungal Infection (IFI) at day 180 according to CD34+ cell dose.

**Figure 3** - Cumulative incidence of Transplanted -related mortality at day 180 (A), and Kaplan Meier estimate of overall survival (B) according to CD34+ cell dose.

**Table 1** - Patients, Disease, Donor and Transplant Characteristics of the 212 enrolled patients

Characteristics	Median (range) N (%)
<b>Recipient</b>	
Age, years	31 (3.3 – 55.8)
Weight, Kg	64 (13.5 – 100)
Female	82 (38.7%)
Positive CMV serology	139 (65.6%)
<b>Underlying diagnosis</b>	
Chronic leukemia*	56 (26.4%)
Acute leukemia**	87 (41.0%)
Other malignancies***	33 (15.6%)
Non malignancies****	36 (17.0%)
Disease stage (for malignancies) Advanced*****	27 (12.7%)
<b>Donor</b>	
Age, years	30 (1.2 – 64.9)
Female	88 (41.5%)
Sex match	96 (45.3%)
Donor F recipient M	61 (28.8%)
ABO match	149 (70.3%)
ABO major mismatch	37 (17.4%)
Positive CMV serology	108 (50.9%)
<b>Transplant</b>	
GVH prophylaxis:	
Cyclosporin + Methotrexate	174 (82.2%)
Cyclosporin + Methotrexate + other	23 (10.8%)
Cyclosporin ± Corticosteroids	15 (7.1%)
Conditioning:	
Irradiation based	86 (40.6%)
TBI + Cy ± others	38
TBI + Mel ± others	42
TAI + low dose Cy	6
Cont. Table 1	

Characteristics	Median (range) N (%)
Chemotherapy based	126 (59.4%)
Bu + Cy	76
Bu + Cy + VP16	24
Cy	21
Bu + others	5
NC, $10^8$ /kg	2.4 (0.28 – 5.97)
CD34, $10^6$ /kg	3.7 (0.07 – 18.7)
CD3, $10^8$ /kg, n = 48	2.2 (0.3-5.4)
NC $\geq 2.4 \times 10^8$ /kg	111 (52.4%)
CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg	142 (67.0%)
Use of prophylactic hematopoietic growth factors (until D+7)	13 (6.1%)

\* 55 chronic myeloid leukemia (CML): 37 in first chronic phase (CP), 5 in second CP, 11 in accelerated phase and 2 in blastic crisis; 1 chronic lymphocytic leukemia.

\*\* 45 acute lymphoblastic leukemia (ALL): 27 in first complete remission (CR1), 6 in CR2, 3 in CR3+, and 9 in relapse/refractory (REL) disease; 42 acute myeloblastic leukemia (AML): 31 in CR1, 7 in CR2 and 4 in REL disease.

\*\*\* 14 Non Hodgkin lymphoma (NHL), 12 Myelodysplastic syndrome (MDS), 7 Other myeloproliferative syndromes.

\*\*\*\* 23 Severe aplastic anemia, 7 Fanconi anemia, 4 paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, 1 congenital dyserythropoietic anemia, 1 Glanzmann thrombasthenia.

\*\*\*\*\* Advanced stage: CML in blastic crisis, AML/ALL in relapse or refractory disease, NHL in resistant or untreated relapse, MDS classified as refractory anemia with excess of blast or with excess of blast in transformation and secondary acute leukemia (Modified from IBMTR classification).

Abbreviations: TBI = total body irradiation, TAI = thoraco-abdominal irradiation, Cy = cyclophosphamide, Mel = melphalan, VP16 = etoposide, NC = nucleated cells, CFU-GM = colony forming unit- granulocyte macrophage.

**Table 2** - Variables included in multivariable analysis for each endpoint. These variables were previously selected as having prognostic value at 10% level

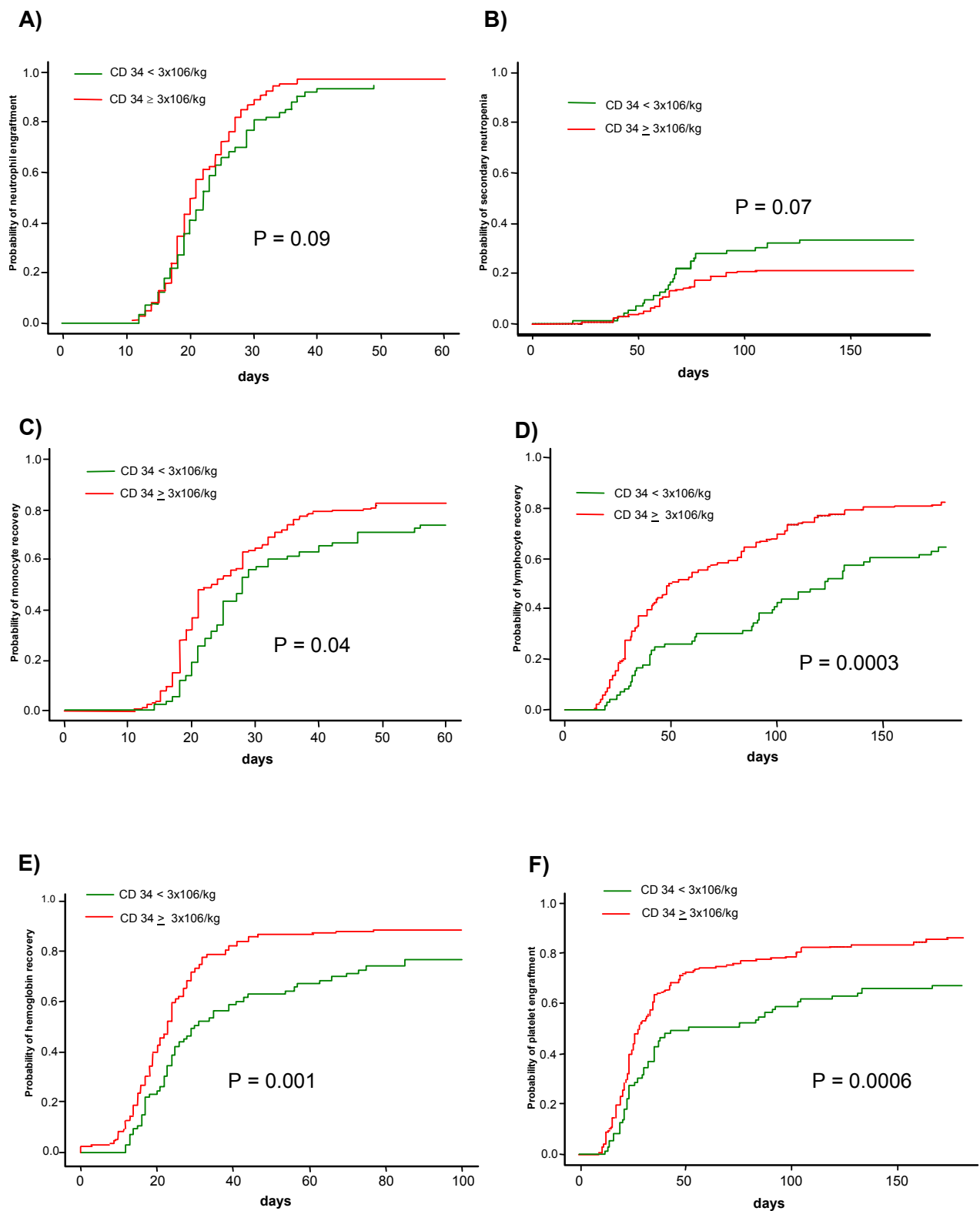
Endpoints	Variables
Neutrophil engraftment	BuCy, CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg, donor female to recipient male, female recipient, irradiation-based regimen, NC $\geq 2.4 \times 10^8$ /kg
Secondary neutropenia	advanced stage, BuCy, CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg, female recipient, NC $\geq 2.4 \times 10^8$ /kg, gender match
Monocyte recovery	BuCy, CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg, female recipient, irradiation-based regimen, weight
Lymphocyte recovery	acute leukemia, age, age of donor, CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg, chronic leukemia, female donor to a male recipient, NC $\geq 2.4 \times 10^8$ /kg. positive CMV serology, weight
Hemoglobin recovery	CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg, chronic leukemia, NC $\geq 2.4 \times 10^8$ / kg, gender match
Platelet engraftment	CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg, female recipient, advanced stage, irradiation-based regimen, malignancy, NC $\geq 2.4 \times 10^8$ /kg
Invasive Fungal Infection	acute leukemia, advanced stage, age, CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg, donor age, NC $\geq 2.4 \times 10^8$ /kg, other malignancies
Transplant-related Mortality	ABO major incompatibility, advanced stage, age, CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg, donor age, donor sex, irradiation-based regimen, NC $\geq 2.4 \times 10^8$ /kg, weight
Overall Survival	ABO major incompatibility, advanced stage, age, BuCy, CD34 $> 3 \times 10^6$ /kg, positive CMV donor serology, donor age, female recipient, irradiation-based regimen, malignancy, NC $\geq 2.4 \times 10^8$ /kg, other malignancies, weight

Abbreviations: BuCy = Busulfan associated to Cyclophosphamide for the preparative regimen; NC = nucleated cells infused; CMV = cytomegalovirus.

**Table 3** - Multivariable analyses of hematopoietic recovery, fungal infection, transplant-related mortality and overall survival

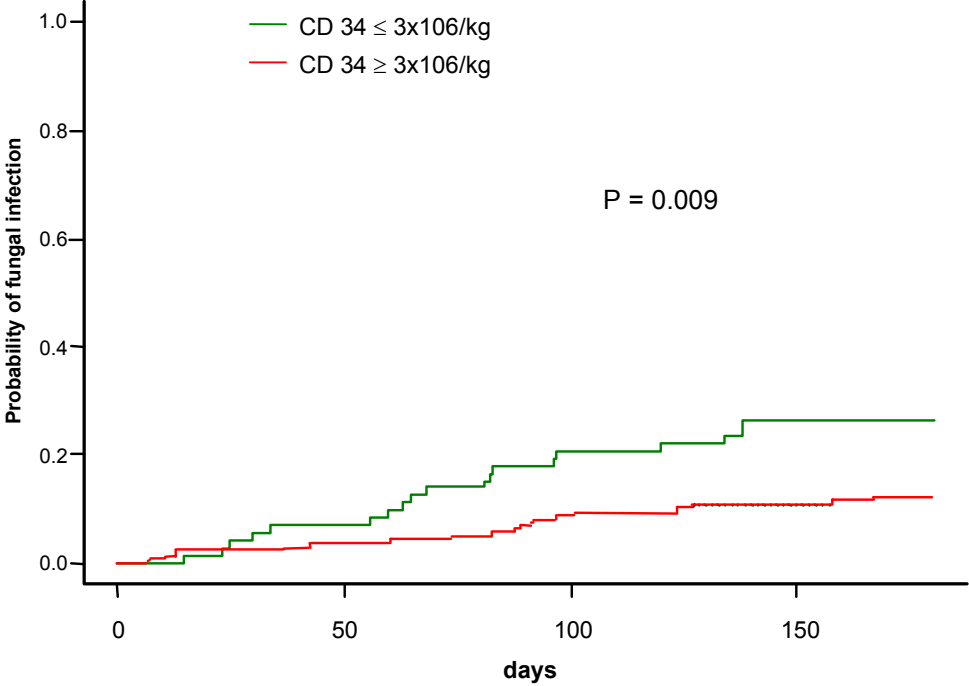
	<b>Hazard Ratio (95%Confidence Interval)</b>	<b>P</b>
<b>Neutrophil engraftment</b>		
Female recipient	1.72 (1.25-2.37)	0.01
CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg	1.37 (1.01-1.85)	0.04
<b>Secondary neutropenia</b>		
Advanced stage of disease	2.12 (1.09-4.12)	0.03
Female recipient	0.51 (0.28-0.94)	0.03
CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg	0.60 (0.35-1.00)	0.05
<b>Monocyte recovery</b>		
Female recipient	1.46 (1.05-2.03)	0.03
CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg	1.47 (1.07-2.03)	0.02
<b>Lymphocyte recovery</b>		
Age of donor *	0.98 (0.97-1.00)	0.01
Positive CMV serology	1.62 (1.15-2.28)	0.006
CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg	1.70 (1.20-2.41)	0.003
<b>Hemoglobin recovery</b>		
Chronic leukemia	1.43 (1.05-1.96)	0.02
CD34 $\geq 3.0 \times 10^6$ /kg	1.77 (1.31-2.39)	0.0002
Gender match	0.74 (0.55-0.98)	0.04
<b>Platelet engraftment</b>		
Advanced stage of disease	0.51 (0.30-0.86)	0.01
Female recipient	1.37 (1.01-1.87)	0.01
CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg	1.98 (1.41-2.77)	0.00008
<b>Invasive Fungal Infection</b>		
Advanced stage of disease	2.49 (1.12-5.57)	0.03
CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg	0.41 (0.21-0.79)	0.008
<b>Transplant-related Mortality</b>		
Age of recipient*	1.04 (1.02-1.06)	0.0004
Advanced stage of disease	2.61 (1.37-4.98)	0.004
Female donor	0.52 (0.29-0.95)	0.03
CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg	0.54 (0.32-0.94)	0.03
<b>Overall survival</b>		
Age of recipient*	1.03 (1.02-1.04)	0.001
Advanced stage of disease	2.53 (1.50-4.25)	0.0005
Female	0.57 (0.36-0.89)	0.01
CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg	0.55 (0.36-0.85)	0.006

\* continuous variable. Abbreviations: CMV= cytomegalovirus.



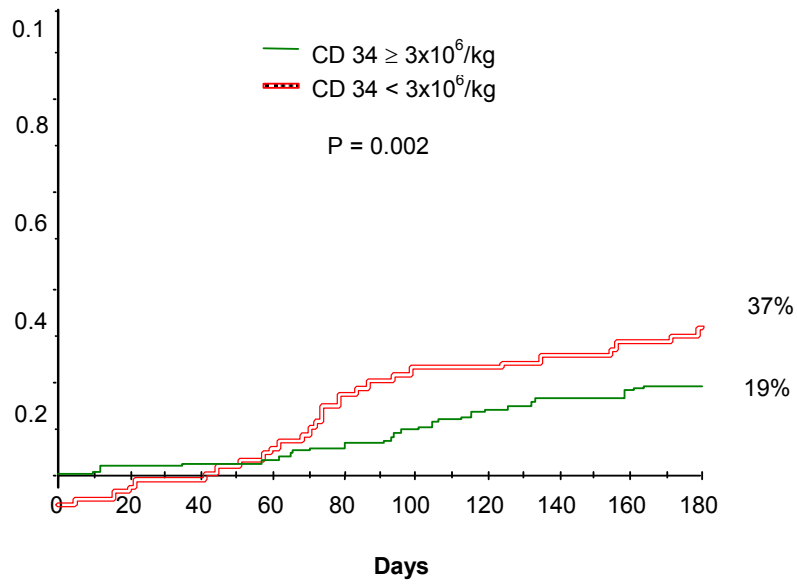
**Figure 1** - Cumulative incidence of hematopoietic recoveries according to CD34 cell dose: a) neutrophil, B) secondary neutropenia, C) monocyte, D) lymphocyte, E) hemoglobin, and F) platelet recoveries.



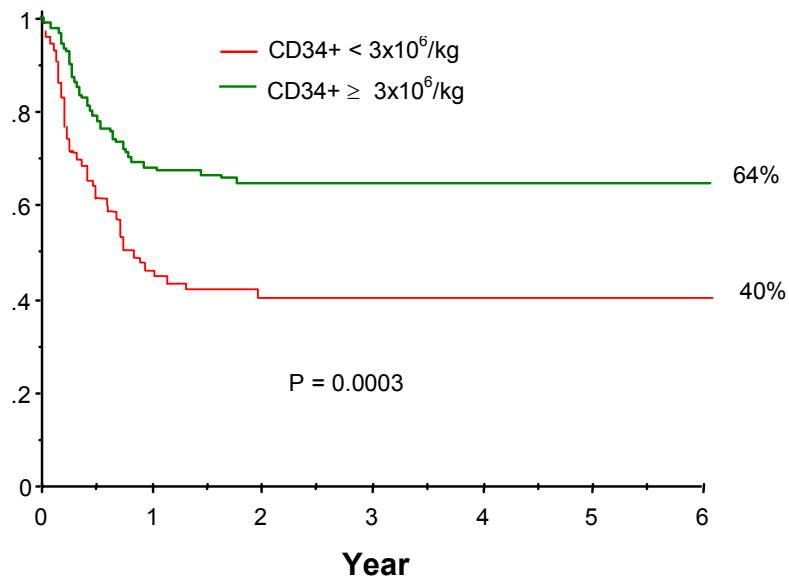


**Figure 2** - Cumulative Incidence of Invasive Fungal Infection (IFI) at day 180 according to CD34+ cell dose

(A)



(B)



**Figure 3 -** Cumulative incidence of Transplanted -related mortality at day 180 (A), and Kaplan Meier estimate of overall survival (B) according to CD34+ cell dose

## **6 - TRADUÇÃO DO ARTIGO**

---

**ASSOCIAÇÃO DA DOSE DE CÉLULAS CD34 COM RECUPERAÇÃO  
HEMATOPOÉTICA, INFECÇÕES E OUTROS DESFECHOS APÓS  
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA DE  
DOADOR FAMILIAR HLA-IDÊNTICO**

**Título curto:** Dose de células CD34 em TMO com doador familiar HLA-idêntico.

**Título da Sessão Científica:** Clinical Observation, Intervention & Therapeutic Trials

**Autores:** Henrique Bittencourt, Vanderson Rocha, Sylvie Chevret, Gerard Socié, Helene Esperou, Agnes Devergie, Liliane Dal Cortivo, Jean-Pierre Marolleau, Federico Garnier, Patricia Ribaud e Eliane Gluckman.

**Instituições:** Unidade de Transplante de Medula Óssea, Laboratório de Terapia Celular e Unidade de Bioestatística, Hospital Saint Louis, Paris, França.

**Autor para correspondências:**

Dra. Eliane Gluckman

Service d'Hématologie-Greffe de Moelle, Hôpital Saint-Louis

1, Avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris, Cedex 10, France

Telefone: 33 (1) 42 49 96 39

Fax: 33 (1) 42 49 96 36

e-mail: [eliane.gluckman@sls.ap-hop-paris.fr](mailto:eliane.gluckman@sls.ap-hop-paris.fr)

Número de palavras - Texto completo/Resumo: 4317/246

## RESUMO

Embora se saiba que a dose de células CD34 influencia diferentes desfechos de transplante com células progenitoras hematopoéticas periféricas e/ou com depleção de células T, pouco se conhece sobre tais reflexos nos transplante com medula óssea não manipulada. Com o objetivo de estudar a repercussão da dose de células CD34+ na reconstituição hematopoética e na incidência de infecções após transplante de medula óssea (TMO), analisamos retrospectivamente 212 pacientes transplantados com medula óssea não manipulada de doador aparentado HLA-idêntico entre janeiro de 1994 e agosto de 1999. A mediana de idade foi de 31 anos e 176 pacientes tinham doenças malignas. A profilaxia da DECH aguda (DECH) consistiu principalmente em ciclosporina associada a metotrexato (n = 174). A mediana de células nucleadas (CN) e de células CD34+ infundidas foi de  $2,4 \times 10^8/\text{kg}$  e  $3,7 \times 10^6/\text{kg}$  respectivamente. Uma dose de células CD34+  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  influenciou significativamente a recuperação de neutrófilos (*Hazard Ratio* (HR) = 1,37; P=0,04), de monócitos (HR = 1,47; P = 0,02), de linfócitos (HR = 1,70; P = 0,003), de hemácias (HR = 1,77; P = 0,0002) e de plaquetas (HR = 1,98; P = 0,00008). A dose de células CD34+ também repercutiu na incidência de neutropenia secundária (HR = 0,60; P = 0,05). As infecções bacterianas e virais não foram afetadas pela dose de células CD34+, embora ela tenha se refletido na incidência de infecções fúngicas (HR = 0,41, P = 0,008). A mortalidade relacionada ao transplante em 180 dias (TRM) e a sobrevida global (SG) em 5 anos foram de 25% e 56%, respectivamente, e ambas foram significativamente afetadas pela dose de células CD34+ (HR = 0,55; P = 0,006 e HR = 0,54; P = 0,03 respectivamente). A SG e a TRM foram, respectivamente, de 64% e, 19% para pacientes que receberam uma dose de células CD34+  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  e de 37% e 40% para os demais. Em conclusão, uma dose de células CD34+  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  melhora a recuperação hematopoética, diminui a incidência de infecções fúngicas e a TRM, além de melhorar a sobrevida global.

**Palavras-chaves:** Dose de células CD34, transplante de medula óssea alogênico, recuperação hematopoética.

## INTRODUÇÃO

O transplante de medula óssea (TMO) alogênico tem sido amplamente utilizado para o tratamento de diferentes desordens hematológicas malignas ou não, doenças metabólicas e imunodeficiências congênitas. Embora células-tronco do sangue periférico estejam sendo usadas de maneira crescente desde 1994, a medula óssea (MO) permanece como a principal fonte de células-tronco hematopoéticas (1). Fatores relacionados ao paciente, à doença e ao transplante (como idade, situação da doença, tipo de doador, etc.) foram extensivamente estudados e têm demonstrado exercer uma influência significativa nos desfechos após TMO. Foi observado que o número total de células nucleadas infundidas era um importante fator prognóstico após transplante de células-tronco hematopoéticas para diferentes desfechos: doses baixas de células nucleadas têm sido correlacionadas com aumento no risco de rejeição (2, 3), taxa de pega mais lenta (3), elevação da mortalidade relacionada ao transplante (TRM) (4, 5, 6) e redução da sobrevida livre de doença (4, 5, 6, 7), resultados estes independentes do tipo de doador (relacionados ou não-relacionados) e da fonte de células-tronco transplantadas (células da medula óssea, do sangue periférico ou do sangue de cordão umbilical (8, 9)

CD34 é a designação de uma molécula de superfície presente em todas as células-tronco hematopoéticas comissionadas ou não e tem sido utilizada como marcador do conteúdo de células-tronco hematopoéticas principalmente no transplante de células-tronco periféricas (autólogo ou alogênico) (10, 11, 12, 13) e nos transplantes de medula óssea (14, 15, 16, 17). Pesquisas com transplante de células-tronco hematopoéticas já demonstraram que a dose de células CD34+ é um fator prognóstico para sobrevida e TRM. A razão para esta influência, porém, não está clara, pois, aparentemente, a recuperação de neutrófilos não é influenciada pela dose dessas células no TMO alogênico. Buscando entender as razões pelas quais a dose de células CD34 tem impacto na TRM e na sobrevida após TMO

alogênico, levantamos a hipótese de que uma melhor recuperação de outros parâmetros da recuperação hematopoética (neutropenia secundária e recuperação dos monócitos, linfócitos, eritrócitos e plaquetas) bem como seu impacto nas infecções poderiam explicar esses fenômenos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Características dos Pacientes e Doadores**

Entre 1<sup>o</sup> janeiro de 1994 e 31 de agosto de 1999, um total de 214 pacientes consecutivos foram submetidos a TMO a partir de um doador irmão HLA-idêntico na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Saint Louis, Paris, França. Dois pacientes foram excluídos por insuficiência de dados no prontuário (n = 1) e ausência da quantificação de células CD34 (n = 1). A tabela 1 resume as características dos pacientes, das doenças, dos doadores e do transplante dos 212 casos analisados.

### **Profilaxia da Doença do Enxerto Contra Hospedeiro, Regimes de Condicionamento e Terapia de Suporte**

A profilaxia para a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda consistiu na associação de ciclosporina (CSA) e metotrexato (MTX) em 174 casos (82,1%). Todos os pacientes receberam TMO não manipulado.

Os condicionamentos para o transplante variaram de acordo com o diagnóstico. Oitenta e seis pacientes (40,6%) receberam um condicionamento contendo irradiação. Outros 80 foram submetidos a irradiação corporal total fracionada (12 Gy em 6 frações divididas em 3 dias) e, em 6 pacientes com anemia de Fanconi, foi feita uma associação de irradiação toracoabdominal (4,5 Gy em dose única) com baixas doses de ciclofosfamida. Cento e vinte e seis pacientes (59,4%) receberam um regime de condicionamento baseado em quimioterapia. Em 24 casos (11,3%) com síndrome de falência medular foi administrada, previamente ao transplante, timoglobulina.

Os pacientes foram isolados em quartos com fluxo laminar e produtos sanguíneos irradiados e leucodepletados foram usados em todos eles. Transfusões com concentrado de hemácias (CH) ou plaquetas eram efetuadas quando a hemoglobina estava abaixo de 8 g/dl e a contagem de plaquetas era inferior a  $20 \times 10^9/l$ . Descontaminação seletiva do intestino com antibióticos orais e profilaxia para vírus/fungos/parasitas foram instituídas de acordo com a rotina do serviço, que permaneceu constante durante os 6 anos do estudo. Tratamento preemptivo com ganciclovir ou *foscarnet* para reativação do citomegalovírus (CMV) com base em testagem da antigenemia CMV foi adotado desde 1994. Fatores de crescimento hematopoéticos (FCH) não foram usados de rotina e apenas 13 pacientes (6,1%) receberam FCH em virtude de sua inclusão em ensaio clínico randomizado, por toxicidade relacionada ao condicionamento ou por infecção severa.

### **Coleta e Manipulação da Medula Óssea e Quantificação do Conteúdo de Células Progenitoras (Células Nucleadas, CFU-GM e CD34)**

A medula óssea foi coletada de ambas as cristas ilíacas posteriores, sob anestesia geral, sendo aspirada com seringas plásticas em alíquotas de 2 a 10 ml e diluída em meio de cultura heparinizado RPMI 1640 (para as medulas coletadas entre 1994 e 1995) ou



em citrato/dextrose (ACD) (para as coletadas entre 1995 e 1999). O processamento de rotina da medula óssea consistiu na preparação de um *buffy-coat*, por centrifugação na Cobe 2991 a 3000 rotações por minuto durante 5 minutos. Células do *buffy-coat* eram diluídas em albumina humana e infundida no paciente. Este método recuperava aproximadamente 85% da contagem inicial de células nucleadas e células CD34 e possibilitava a concentração para 10% do volume inicial, pela eliminação do sobrenadante e parte dos eritrócitos. Em situações de incompatibilidade maior ABO entre o doador e o receptor, as hemácias eram eliminadas por centrifugação na Cobe 2991. Em resumo, 450 ml do *buffy-coat* diluído, com o hematócrito ajustado para menos de 20%, eram misturados a 150 ml de ficoll e centrifugados durante 15 minutos a 400 g. Após a lavagem do ficoll, as células mononucleares eram diluídas em albumina humana e infundidas no paciente. Este processo possibilita a recuperação de 20% do volume inicial de células, das quais 75% são mononucleares, e de 56% das células CD34 com menos de 0,1% do volume original de hemácias.

Contagem automática de células e quantificação das células CD34 foram realizadas antes e após cada processamento, mas somente a última foi levada em conta neste estudo. A quantificação das células CD34 foi realizada conforme descrito em estudo prévio por análise de fluorescência (18). Em resumo, um milhão de células da medula óssea na fase inicial e final do procedimento foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente com 20  $\mu$ l de anticorpos monoclonais HPCA2-PE e anti-CD45-FITC (Becton Dickinson, França). A análise de imunofluorescência foi realizada utilizando-se um FACScan de 5 parâmetros (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA, EUA). O número total de células CD34 obtidas no final do procedimento corresponde ao número de células infundidas ao paciente.

## Definição dos Desfechos e Análise Estatística

### *Reconstituição Hematopoética*

**Recuperação de neutrófilos** foi definida como o primeiro de 3 dias consecutivos com neutrófilos acima de  $0,5 \times 10^9/l$  durante os primeiros 60 dias após o transplante. **Neutropenia secundária** foi definida como a recuperação de neutrófilos seguida por sua diminuição abaixo de  $0,5 \times 10^9/l$  por pelo menos 3 dias. **Recuperação de monócitos** foi definida como o primeiro dia após o transplante com a contagem de monócitos acima de  $0,3 \times 10^9/l$  durante os primeiros 60 dias após o transplante. **Recuperação dos linfócitos** foi definida como o primeiro dia com contagens de linfócitos acima de  $0,5 \times 10^9/l$  durante os primeiros 180 dias após o transplante. **Recuperação das plaquetas** foi definida como o primeiro de sete dias de plaquetas (sem transfusão) acima de  $20 \times 10^9/l$  durante os primeiros 180 dias após transplante. **Recuperação das hemácias** foi definida como o primeiro de dez dias de hemoglobina (sem transfusão) acima de 8 g/dl durante os primeiros 100 dias após o transplante.

### *Definições das Infecções*

A data do primeiro episódio de infecção severa bacteriana, viral ou fúngica de cada paciente foi analisada neste estudo. As infecções por CMV foram incluídas no grupo de infecções virais severas para fins estatísticos. A definição das infecções vem listada abaixo.

## Infecção Viral Severa

**Doença por CMV** foi diagnosticada de acordo com critérios previamente publicados (19). Infecção por vírus *Herpes simplex* (HSV) foi definida como doença respiratória, digestiva ou neurológica com o HSV isolado em cultura. **Infecção por Adenovírus** foi diagnosticada se o adenovírus estivesse presente em um sítio do organismo independentemente da técnica utilizada, exceto imunoistoquímica em biópsia. Doença por adenovírus provável foi definida como a presença do vírus em dois ou mais sítios do organismo independentemente da técnica adotada, exceto imunoistoquímica em biópsia. Doença por adenovírus definitiva foi definida pelo seu achado em análise imunoistoquímica em biópsia ou cultura positiva em biópsia (exceto gastrointestinal) ou líquido cefalorraquidiano. **Outras infecções virais** foram consideradas como severas quando um vírus foi isolado de um local de manifestação da doença e uma hospitalização para tratamento antiviral foi necessária. **Infecção por CMV** foi definida como a antigenemia positiva (presença de 2 ou mais núcleos positivos por 200.000 leucócitos).

## Infecção Bacteriana Severa

Foi definida como tal quando sepse, pneumonia e/ou choque séptico foram diagnosticados de acordo com critérios publicados (20, 21). Também foi considerada pneumonia quando sinais clínicos/radiológicos melhoraram após terapia antibacteriana, mas não antifúngica, em pacientes com cultura de sangue e/ou lavado broncoalveolar (LBA) negativos.

## Infecção Fúngica Invasiva

**Candidemia** foi definida como uma ou mais culturas positivas para *Candida sp.* **Candidíase invasiva** foi definida como sinais clínicos e/ou radiológicos de infecção fúngica com uma ou mais culturas positiva para *Candida sp.* **Infecção invasiva por *Aspergillus de certeza*** foi definida como a presença de evidência histo ou citopatológica por punção aspirativa ou biópsia de *Aspergillus sp.* com dano tecidual associado ou cultura positiva obtida por procedimento estéril com sinais clínicos ou radiológicos compatíveis com infecção. Foi também considerada como **infecção invasiva provável por *Aspergillus*** a presença de sinais clínicos e radiológicos de aspergilose invasiva com antigenemia positiva (sem identificação microbiológica). **Infecção fúngica invasiva de certeza** foi definida pela evidência histo ou citopatológica de fungo (outro que não *Aspergillus sp.*) proveniente de aspiração com agulha ou biópsia com evidência de dano tecidual associado ou cultura positiva obtida por procedimento estéril com sinais clínicos e radiológicos compatíveis com infecção. As definições ora tratadas foram adaptadas de Lortholary e colaboradores (22).

## *Outros Desfechos*

**Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda e crônica** foram diagnosticadas e estadiadas de acordo com critérios já publicados (23, 24, 25). Todos os pacientes foram considerados avaliáveis para DECH aguda a partir do primeiro dia do transplante. Ocorrência de DECH crônica foi avaliada entre os que sobreviveram com pega sustentada a partir do dia 100 pós-transplante.

**Sobrevida** foi calculada da data do transplante até o óbito por qualquer causa. A **mortalidade relacionada ao transplante** foi calculada da data do transplante até o óbito relacionado ao transplante e não relacionado à recidiva ocorrido até o dia 180.

## Análise Estatística

A data referência adotada foi primeiro de março de 2000. As análises estatísticas foram realizadas independentemente para cada desfecho, ou seja, recuperação de neutrófilos, monócitos, linfócitos, hemoglobina e plaquetas, além do tempo para neutropenia secundária e para infecção bacteriana, viral e fúngica.

As incidências de cada evento foram estimadas de forma não-paramétrica. Após, cada análise de prognóstico foi baseada no mesmo procedimento descrito abaixo. Inicialmente, modelos de regressão univariável foram realizados com *Hazard Rate* (HR) e seu intervalo de confiança de 95% (95CI) estimado. O valor preditivo de cada uma das seguintes variáveis foi verificado: idade do doador e do receptor, sexo do doador e do receptor, peso do receptor, sorologia CMV do doador e do receptor, semelhança de sexo, semelhança de tipagem ABO, incompatibilidade maior ABO, doadora feminina para receptor masculino, diagnóstico de malignidade, de leucemia crônica, de leucemia aguda, de malignidade que não leucemia, estágio avançado da doença, uso de um condicionamento baseado em radiação, uso de busulfan+ciclofosfamida (BuCy), dose de células nucleadas e CD34 infundidas por quilograma de peso corporal. A dose de células CD34 ( $3 \times 10^6/\text{kg}$ ) foi introduzida após dicotomização de acordo com valor com significância clínica, definido segundo publicação prévia do grupo do *National Institute of Health* (NIH) (16). Modelos de regressão multivariados foram então realizados nos quais todas as co-variáveis previamente selecionadas

como tendo valor prognóstico (nível de  $P = 10\%$ ) eram introduzidas simultaneamente com a dose de células CD34 (tabela 2).

As ferramentas estatísticas empregadas para estimar a incidência e verificar a influência de cada fator sobre cada desfecho, isoladamente ou em conjunto, foram o estimador de Kaplan-Meier e o modelo de regressão de Cox. Entretanto, como a recuperação dos subtipos celulares e de hemoglobina e o aparecimento de infecção eram eventos que competiam com a morte do paciente, a estimação da incidência desses eventos baseou-se na estimativa não-paramétrica das curvas de incidência acumulada, enquanto as análises preditivas valeram-se dos modelos de chance proporcional para essas subdistribuições de riscos competitivos (26).

A correlação entre dose de CN e CD34 foi feita pelo teste de correlação de Pearson. O teste de Mann Whitney foi empregado para comparar diferenças na dose de CN e CD34 entre pacientes com diferenças maiores de tipagem ABO e o restante da população estudada.

Todos os testes estatísticos eram bicaudais, com um valor de  $P$  igual ou inferior a 0,05 indicando significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos pacotes estatísticos SAS 8.1 (SAS Inc, Cary, NC) e Splus (MathSoft, Inc, Seattle).

## RESULTADOS

### Composição do Enxerto e Infusão

A dose mediana de CN e a de células CD34 infundidas foram de 2,4 (intervalo: 0,28 - 5,97)  $\times 10^8/\text{kg}$  e de 3,7 (intervalo: 0,07 - 18,7)  $\times 10^6/\text{kg}$  respectivamente, tendo havido

moderada, embora significativa, correlação entre elas ( $R = 0,58$ ;  $P < 0,0001$ ). Como concentrávamos o enxerto em situações de incompatibilidade maior ABO, a mediana de CN/kg foi significativamente maior em pacientes com doador ABO compatível ou com incompatibilidade menor do que nos com doador com incompatibilidade maior ABO ( $2,5$  [intervalo:  $0,43 - 5,97$ ]  $\times 10^8/\text{kg}$  *versus*  $0,8$  [intervalo:  $0,28 - 3,40$ ]  $\times 10^8/\text{kg}$  –  $P < 0,001$ ). A dose mediana de células CD34/kg foi também maior nos pacientes com doador ABO compatível ou com incompatibilidade menor do que nos com doador com incompatibilidade ABO maior:  $3,9$  (intervalo:  $0,07 - 18,70$ )  $\times 10^8/\text{kg}$  e  $2,9$  (intervalo:  $0,87 - 14,00$ )  $\times 10^8/\text{kg}$ , respectivamente ( $P = 0,03$ ).

## Recuperação Hematopoética

### *Recuperação de Neutrófilos*

Seis pacientes morreram nos primeiros 28 dias após o transplante sem recuperação dos neutrófilos e dois não apresentaram pega. Duzentos e quatro (96,2%) pacientes tiveram contagem de neutrófilos acima de  $0,5 \times 10^9/\text{l}$ . A taxa de incidência cumulativa de recuperação no dia 60 foi de 96,2%, com incidência específica de 97,1% nos pacientes que receberam  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  e de 93,1% nos que receberam  $< 3 \times 10^6/\text{kg}$  células CD34+ (figura 1A). Os resultados da análise multivariável (tabela 3) mostraram que a infusão de mais de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  de células CD34+ (HR = 1,37; 95CI = 1,01 a 1,85;  $P = 0,04$ ) estava associada a uma recuperação mais rápida de neutrófilos.

### *Neutropenia Secundária*

Neutropenia abaixo de  $0,5 \times 10^9/l$  após pega inicial foi vista em 54 (25,5%) pacientes, com uma taxa de incidência cumulativa no dia 180 de 25,6%. A incidência de neutropenia secundária foi menor para os pacientes que receberam dose de células CD34  $\geq 3 \times 10^6/kg$  do que para os que receberam doses menores (21,6% *versus* 33,3%;  $P = 0,07$  – figura 1B). Na análise multivariável, uma dose de células CD34 de pelo menos  $3 \times 10^6/kg$  (HR = 0,60; 95CI = 0,35 a 1,02;  $P = 0,05$ ) associou-se com menor incidência de neutropenia secundária.

### *Recuperação dos Monócitos*

Um total de 169 (79,7%) pacientes atingiu recuperação dos monócitos, com uma taxa estimada de 79,2% no dia 60. A taxa cumulativa estimada de recuperação dos monócitos nos pacientes que receberam uma dose de células CD34  $\geq 3 \times 10^6/kg$  foi de 82,0% *versus* 74,0% nos que receberam menos ( $P = 0,004$  – figura 1C). A análise multivariada (tabela 3) mostrou que uma dose de células CD34 superior a  $3 \times 10^6/kg$  (HR = 1,47; 95CI = 1,07 a 2,03;  $P = 0,02$ ) associou-se com recuperação mais rápida dos monócitos.

### *Recuperação dos Linfócitos*

Até o dia 180, a taxa cumulativa estimada de recuperação dos linfócitos foi de 75,9%, com 161 (75,9%) pacientes atingindo uma contagem de linfócitos  $\geq 0,5 \times 10^9/l$ . O tempo para a recuperação dos linfócitos foi significativamente mais rápido nos pacientes que



receberam  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  células CD34+ (82%) do que nos que receberam menos (64,4%;  $P = 0,0003$ ) (figura 1D). Na análise univariada, a idade e o peso do receptor, o diagnóstico de leucemia aguda ou crônica, a idade do doador, uma dose de células nucleadas superior a  $2,4 \times 10^8/\text{kg}$  e de células CD34 acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  afetaram de maneira significativa a recuperação dos linfócitos. Na análise multivariada (tabela3), uma dose de células CD34 superior a  $3 \times 10^6/\text{kg}$  (HR = 1,70; 95CI = 1,07 a 2,03;  $P = 0,02$ ) foi confirmada como positivamente associada com o desfecho, assim como a idade do doador e a sorologia CMV positiva.

### *Recuperação da Hemoglobina*

A incidência cumulativa estimada de recuperação da hemoglobina no dia 100 foi de 84,9%. O tempo para alcançar um nível de hemoglobina  $\geq 8$  g/dl em pacientes que receberam uma dose de células CD34 de pelo menos  $3 \times 10^6/\text{kg}$  foi significativamente mais rápido do que nos restantes (89,2% *versus* 76,7%, respectivamente;  $P = 0,001$  – figura 1E). O resultado da análise multivariada mostrou que a dose de células CD34+ acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  (HR = 1,77; 95CI = 1,31 a 2,39;  $P = 0,0002$ ) associou-se com recuperação mais rápida da hemoglobina (tabela 3).

### *Recuperação das Plaquetas*

A incidência cumulativa estimada de recuperação de plaquetas no dia 180 foi de 79,7%. As taxas cumulativas estimadas de recuperação de plaquetas foram de 86,3% *versus* 67,1% nos pacientes que receberam mais ou menos de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  de células CD34 respectivamente (figura 1F). Receptor do sexo feminino ( $P = 0,025$ ), dose de células nuclea-

das acima de  $2,4 \times 10^8/\text{kg}$  ( $P = 0,017$ ) e dose de células CD34 superior a  $3 \times 10^6/\text{kg}$  ( $P = 0,0006$ ) associaram-se significativamente a uma pega de plaquetas mais rápida na análise univariada. Por outro lado, diagnóstico de malignidade ( $P = 0,10$ ) e estágio avançado da doença ( $P = 0,023$ ) estavam associados com uma pega de plaquetas mais lenta. Aplicando-se o modelo multivariado de Cox (tabela 3), o fator mais favorável afetando a recuperação plaquetária foi a infusão de uma dose de células CD34 acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  ( $\text{HR} = 1,98$ ;  $95\text{CI} = 1,41$  a  $2,77$ ;  $P = 0,00008$ ).

## Infecções

Até o dia 180 pós-transplante, 133 (62,7%) pacientes tinham apresentado pelo menos um episódio de infecção severa bacteriana, viral ou fúngica microbiológica ou clinicamente documentada. Infecções foram diretamente responsáveis por 39 (52,0%) das 75 mortes relacionadas ao transplante no período total de duração do estudo. A taxa de incidência cumulativa de pacientes infectados no dia 180 foi de 62,7%.

Episódios de infecção bacteriana ocorreram em 60 (28,3%) pacientes. A incidência acumulada de pacientes com pelo menos um primeiro episódio de infecção foi de 28,4% no dia 180. De maneira semelhante, a incidência acumulada de pacientes que sofreram pelo menos um episódio de infecção viral foi de 42,0% nesse mesmo período, com um total de 91 eventos (principalmente infecções por CMV). A dose de células CD34+ não influenciou a incidência de infecções virais ou bacterianas ( $P = 0,40$  e  $P = 0,26$  respectivamente).

A probabilidade estimada de pelo menos um primeiro evento de infecção fúngica invasiva (IFI) no dia 180 foi de 17%. A figura 2 mostra a diferença de incidência de acordo com o número de células CD34+ infundidas (12,2% em pacientes com uma dose de células CD34  $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$  e 26,3% naqueles com doses menores;  $P = 0,009$ ). Houve 26 infecções

por *Aspergillus sp.* (7 não comprovadas microbiologicamente), 7 candidemias e 3 outras infecções fúngicas disseminadas (2 episódios de candidíase disseminada e 1 de infecção disseminada por *Malasseria furfur*). Na análise multivariada, uma dose de células CD34  $\geq 3 \times 10^6$ /kg diminuiu a probabilidade de uma episódio de IFI (HR = 0,41; 95CI = 0,21 a 0,79; P = 0,008) quando ajustada para as variáveis de confusão.

## Doença do Enxerto contra o Hospedeiro

DECH aguda de grau II ou superior ocorreu em 101 (47,6%) pacientes, com uma taxa cumulativa no dia 100 de 49%. DECH aguda de grau III ou IV acometeu 36 (17%) pacientes, com uma incidência estimada de 17% no dia 100. DECH crônica foi observada em 86 (49,1%) dos 175 pacientes a risco, dos quais 42 tiveram doença limitada e 44, extensiva. A incidência cumulativa de DECH crônica em 5 anos foi de 54%. A dose de células CD34+ não afetou a ocorrência de DECH aguda (graus II-IV) (P = 0,84) ou crônica (P = 0,39).

## Mortalidade Relacionada ao Transplante e Sobrevida

Cinquenta e dois (24,5%) pacientes morreram de complicações relacionadas ao transplante durante os primeiros 180 dias. As principais causas de óbito relacionadas ao transplante foram: infecção fúngica invasiva (n = 15), DECH (n = 11), infecção bacteriana (n=7) e síndrome de angústia respiratória aguda (n = 4). A estimativa da TRM em 180 dias foi de 37% para os pacientes que receberam uma dose de células CD34 abaixo de  $3 \times 10^6$  e de 19% para os demais (figura 3). Na análise multivariada de Cox, a infusão de mais de  $3 \times 10^6$  CD34 células por kg (HR = 0,54;95CI = 0,32 a 0,94; P = 0,03) foi associada com uma

redução na TRM. A mortalidade relacionada a infecção durante os primeiros 180 dias foi mais alta nos pacientes que receberam menos de  $3 \times 10^6$  células CD34 (16,4% *versus* 8,6% para os que receberam uma dose mais alta).

Com um seguimento mediano de 3,4 anos (intervalo 0,6 a 6,1), 121 (57,1%) pacientes estavam vivos em 1º março de 2000. Quatro pacientes foram perdidos. A sobrevida global estimada para toda a população foi de 56%. A figura 3 mostra as curvas de sobrevida de acordo com as doses de células CD34 infundidas. Noventa e um (42,9%) dos pacientes morreram: 14 (6,6%) após recidiva, 75 (35,4%) por complicações relacionadas ao transplante e 2 por outras causas. A análise multivariada mostrou que uma dose de células CD34+ superior a  $3,0 \times 10^6/\text{kg}$  (HR = 0,55; 95CI = 0,36 a 0,85; P = 0,006) estava ligada a melhora na taxa de sobrevida.

## DISCUSSÃO

A importância da quantificação das células CD34 tem sido claramente demonstrada no âmbito do transplante de células-tronco hematopoéticas periféricas autólogas ou alogênicas (10-13). Estudos sobre a dose dessas células em transplante alogênico de medula óssea tem se restringido aos relacionados que empregam T- depleção ou aos não-relacionados não manipulados. Mavroudis e colaboradores foram os primeiros a sugerir, em apenas 28 pacientes que receberam enxerto de medula óssea T- depletado, que a dose de células CD34 predizia a sobrevida, a mortalidade relacionada ao transplante e a taxa de recuperação hematológica (14). Mais recentemente, o mesmo grupo mostrou que a dose de células CD34 acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  correlacionava-se com melhor taxa de sobrevida e menor recidiva e TRM (16). Além desses trabalhos, dados sobre a influência do conteúdo dessas células sobre a sobrevida, a TRM e a recuperação de plaquetas têm sido publicados so-

mente em TMO não-relacionado não manipulado (15). Entretanto, nessa pesquisa, assim como em outra realizada (17), nenhuma correlação entre a dose de células CD34 e a pega dos neutrófilos foi demonstrada.

Neste estudo de coorte retrospectivo unicêntrico, foi possível demonstrar que a dose de células CD34 influencia significativamente a reconstituição hematopoética. De fato, nossos dados confirmam e ampliam achados prévios de que uma dose elevada de células CD34 melhora a recuperação hematopoética (14).

A maioria das pesquisas em transplante alogênico de medula óssea ou células progenitoras periféricas não mostra correlação entre a dose de células CD34 e a recuperação de neutrófilos (14, 15, 18, 26, 27). Entretanto, nós encontramos uma correlação significativa entre uma dose de células CD34 na medula óssea acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  e uma pega mais rápida dos neutrófilos, em concordância com os resultados de Shingal (29). Também de importância foi o achado de que a incidência de neutropenia secundária correlaciona-se com a dose de células CD34. Pacientes que receberam uma dose inferior a  $3 \times 10^6/\text{kg}$  tinham risco maior de apresentar neutropenia secundária. A pega inicial dos neutrófilos pode ser dependente de progenitores tardios CD34+ já engajados para a linhagem granulocítica, mesmo que outras células acessórias, como os linfócitos T, também exerçam um papel na pega (30, 31). Estudos sobre neutropenia secundária após TMO alogênico são escassos. A ocorrência de neutropenia após profilaxia com ganciclovir de infecção por CMV correlaciona-se melhor com baixa celularidade da medula óssea no dia 21 pós-transplante do que com outros marcadores de pega, como o tempo para pega de neutrófilos ou plaquetas (32). Sierra e colaboradores mostraram que uma dose mais baixa de células nucleadas correlaciona-se com maior incidência de neutropenia abaixo de  $0,5 \times 10^9/\text{l}$  nas primeiras 15 semanas após o transplante (6). O grupo do NIH observou que uma dose de células CD34+ acima de  $2 \times 10^6/\text{kg}$  correlacionava-se com uma necessidade significativamente menor de G-CSF para manter as contagens de neutrófilos durante tratamento com ganciclovir (14).

Adicionalmente, demonstramos que uma recuperação mais rápida de monócitos ocorre com uma dose de células CD34+ acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$ . A reconstituição dos linfócitos também foi afetada pela dose de células infundidas. Pacientes que receberam mais de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  de células CD34+ têm uma mediana de recuperação de linfócitos ( $> 0,5 \times 10^9/\text{l}$ ) 2 meses menor do que aqueles que receberam uma dose menor. Recentemente descrevemos, em 67 pacientes, que a recuperação das subpopulação de linfócitos T CD3+, CD8+ e B era influenciada pela dose de células CD34 (33).

Em relação à reconstituição eritróide, a dose de células CD34 também se correlacionou com recuperação mais rápida da hemoglobina. Estudos prévios em transplante autólogo de células progenitoras periféricas e em TMO alogênico já tinham sugerido menor necessidade de transfusão de concentrado de hemácias e independência mais rápida de transfusão de hemácias com uma dose mais alta de células CD34 (14, 34). A recuperação das plaquetas também correlacionou-se com a dose de células infundidas, como já havia sido observado por outros grupos (11, 14, 15, 17, 27, 35). Recuperação mais completa e sustentada eritróide/megacariocítica parece ser alcançada quando se infunde uma dose mais alta de células CD34 positivas, possibilitando aos pacientes uma independência de transfusões mais precoce.

Como já havia sido previamente relatado, nossos dados confirmam que a dose de células CD34 influencia a TRM e a sobrevida global (14-17). Recuperação imunológica lenta ou inadequada associa-se com alta taxa de infecção após transplante de medula óssea. Storek e colaboradores mostraram associação entre contagem baixa de monócitos e de células B no dia 80 e maior incidência de infecções severas (principalmente virais e fúngicas) em TMO alogênico (36). Neutropenia secundária após profilaxia com ganciclovir para infecções por CMV mostrou associação com maior taxa de bacteremia e infecções fúngicas (32). Nós levantamos a hipótese de que, como a dose de células CD34 influencia significativamente a recuperação hematopoética, uma recuperação imunológica mais rápida e robusta ocorre com doses mais altas e, conseqüentemente, reduz o risco de morte relacionada a in-

fecção e a TRM. De fato, este é o primeiro estudo que constata que a dose de células CD34+ tem repercussões significativas sobre as infecções fúngicas, evento relativamente tardio após TMO e causa importante de óbito relacionado ao transplante (37, 38). Embora, certamente, mereça confirmação posterior, esta associação é de uma importância clínica óbvia. Além disso, nossos dados mostram que a recuperação de monócitos e linfócitos é mais rápida com doses mais elevadas de células CD34. A dose de células infundidas se reflete na reconstituição neutrofílica-macrofágica-monocitária, a qual desempenha um papel essencial para a proteção contra infecções fúngicas (39, 40). Como as infecções fúngicas invasivas ocorrem mais tardiamente após o TMO, a neutropenia secundária, mais que a recuperação dos neutrófilos, é fator de risco importante, o que pode também explicar a maior taxa de infecção fúngica nos pacientes que receberam uma dose menor de células CD34. Finalmente, a principal causa de morte associada ao transplante foram as infecções (24 das 53 mortes que ocorreram durante os primeiros 180 dias após o transplante), com uma maior taxa de mortalidade associada a infecções em pacientes que receberam uma dose mais baixa de células.

Uma das vantagens deste estudo é que ele provém de uma só instituição, na qual 212 pacientes consecutivos foram submetidos a transplante de medula óssea com a mesma técnica de coleta e tratados com idêntica terapia de suporte. A técnica de quantificação de células CD34 não se alterou durante todo o período da pesquisa. Uma potencial desvantagem do nosso estudo é que o ponto de corte adotado para a dose de células CD34 pode não ser útil para outras instituições, pois a quantificação das células pode variar entre os centros. Sabe-se que a quantificação de células CD34 é um melhor marcador para a célula progenitora hematopoética. A quantificação de GM-CFU tem sido utilizada, porém é demorada e seu resultado torna-se disponível somente após duas semanas. A dose de células nucleadas tem sido amplamente empregada, pois é um método simples e tem mostrado correlação com a recuperação de neutrófilos, plaquetas e linfócitos (3, 5, 7). Entretanto, pouco se conhece sobre a relação entre a dose dessas células e outros parâmetros de recupe-

ração hematológica a longo prazo. Na análise multivariada, constatamos que a dose de células CD34 predisse melhor a recuperação hematopoética que a de células nucleadas. Infelizmente, não quantificamos outros subtipos de células no enxerto que poderiam influenciar o desfecho. A questão que se coloca a partir deste estudo é de como se pode aumentar a dose de células CD34+. Diversas maneiras de atingir esta meta têm sido propostas: células progenitoras periférica estimuladas por G-CSF oferecem um enxerto com um conteúdo de células CD34 maior quando comparado com medula óssea (17). A controvérsia permanece no que concerne a uma possível maior incidência de DECH crônica após transplante com células progenitoras periféricas (41-43). A estimativa da dose de células CD34+ no início da coleta, como sugerido recentemente, poderia ser uma oportunidade para melhorar o desfecho do transplante com custo baixo (44). O uso de fatores de crescimento hematopoéticos (rhG-CSF ou rhGM-CSF) em casos selecionados após a pega poderia constituir uma opção a ser testada.

Em conclusão, nossos resultados mostram que, em TMO HLA-idêntico não manipulado, uma dose de células CD34+ acima de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  melhora a recuperação hematopoética e reduz de maneira significativa o risco de neutropenia secundária, resultando em redução na taxa de infecção fúngica e de TRM e em melhora na sobrevida.



## BIBLIOGRAFIA

1. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Blood and marrow transplantation activity in Europe, 1997. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.*, 1999;24:231-45.
2. Storb R, Prentice RL, Thomas ED. Marrow transplantation for treatment of aplastic anemia. An analysis of factors associated with graft rejection. *N Engl J Med.*, 1977; 296: 61-6.
3. Niederwieser D, Pepe M, Storb R, Loughran, Jr. TP, Longton G. Improvement in rejection, engraftment rate and survival without increase in graft-versus-host disease by high marrow cell dose in patients transplanted for aplastic anaemia. *B J Haematol.*, 1988; 69: 23-28.
4. Mehta J, Powles R, Singhal S, et al. Early identification of patients at risk of death due to infections, hemorrhage, or graft failure after allogeneic bone marrow transplantation on the basis of the leukocyte counts. *Bone Marrow Transplant.*, 1997;, 19: 349-355.
5. Sierra J, Storer B, Hansen JA, et al. Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: The effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood.*, 1997; 89: 4226-4235.
6. Sierra J, Storer B, Hansen JA, et al. Unrelated donor marrow transplantation for acute myeloid leukemia: An update of the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 397-404.
7. Barrett AJ, Rindgen O, Zhang M-J, et al. Effect of nucleated marrow cell dose on relapse and survival in identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Blood.* 2000; 95: 3323-3327.

8. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med.*, 1997; 337: 373-81.
9. Russell JA, Larratt L, Brown C, et al. Allogeneic blood stem cell and bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplasia: influence of stem cell source on outcome. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 24: 1177-1183.
10. Korbling M, Huh YO, Durett A, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease *Blood.*, 1995; 86: 2842-8.
11. Kiss JE, Rybka WB, Winkelstein A, et al. Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1997;, 19: 303-310.
12. Weaver CH, Potz J, Redmond J, et al. Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34+ cell content. *Bone Marrow Transplant*, 1997;, 19: 1103-10.
13. Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH. Effect of CD34+cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol.*, 1999; 17: 1227-1233.
14. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, et al. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood.*, 1996; 88: 3223-3229.
15. Anasetti C, Heimfeld S, Rowley S, et al. Higher CD34 cell dose is associated with improved survival after marrow transplantation from unrelated donors [abstract]. *Blood.*, 1999; 94: 561a.

16. Bahçeci E, Read EJ, Leitman S, et al. CD34+ cell dose predicts relapse and survival after T-cell-depleted HLA-identical haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2000; 108: 408-414.
17. Singhal S, Powles R, Kulkarni S, et al. Comparison of marrow and blood cell yields from the same donors in a double-blind, randomized study of allogeneic marrow vs. Blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25: 501-505.
18. Morariu-Zamfir R, Rocha V, Devergie A, et al. 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.
19. Ljungman P, Griffiths P. Definitions of cytomegalovirus infection and disease. In: Michelson S, Plotkin SA, eds. *Proceedings of the Fourth International Cytomegalovirus Workshop: Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease.* Paris, France: Elsevier Science Publishers BV,, 1993:233-237.
20. American Society of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.*, 1992; 20: 864-874.
21. Lossos IS, Breuer R, Or R, et al. Bacterial pneumonia in recipients of bone marrow transplantation. *Transplantation.*, 1995; 60: 672-678.
22. Lortholary O, Ascoglu S, Moreau P et al. Invasive Aspergillosis as an opportunistic infection in nonallografted patients with multiple myeloma: A European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 41-46.
23. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation,* 1974; 18: 295-304.
24. 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: 204-217.

25. Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients. Adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood.*, 1981; 57: 267-276.
26. Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *JASA*, 1999; 94: 496-509.
27. Pavletic ZS, Bishop MR, Tarantolo SR, et al. Hematopoietic recovery after allogeneic blood stem-cell transplantation compared with bone marrow transplantation in patients with hematopoietic malignancies. *J Clin Oncol.*, 1997; 15: 1608-1616.
28. Lickliter JD, McGlave PB, DeFor TE, et al. Matched-pair analysis of peripheral blood stem cells compared to marrow for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 723-8.
29. Singhal S, Powles R, Treleaven J, Kulkarni S, Sirohi B, Horton C, et al. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should 2x10<sup>6</sup>/kg CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 489-496.
30. Rocha V, Carmagnat M, Chevret S, et al. Influence of bone marrow graft lymphocyte subset on the outcome of HLA identical sibling transplants. *Exp Hematol.* 2001; 29: 1347-1352.
31. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, et al. The number of donor CD3+ cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood.* 2001 97: 383-387.
32. Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, Davis C, Boeckh M. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: Risk factors and outcome. *Blood.*, 1997; 90: 2502-2508.
33. Garnier F, Porcher R, Carmagnat M, et al. Factors influencing lymphocyte subsets recovery after HLA identical sibling bone marrow transplantation (BMT). Role of nucleated and CD34+ cell dose [abstract]. *Blood* 2000; 11: 409a.

34. Pérez-Simón JA, Martín A, Caballero D, et al. Clinical significance of CD34+ cell dose in long-term engraftment following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 24: 1279-1283.
35. Lowenthal RM, Faberes C, Marit G, et al. Factors influencing haemopoietic recovery following chemotherapy-mobilised autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for haematological malignancies: a retrospective analysis of a 10-year single institution experience. *Bone Marrow Transplant.*, 1998;22:763-70.
36. Storek J, Espino G, Dawson MA, Storer B, Flowers ME, Maloney DG. Low B-cell and monocyte counts on day 80 are associated with high infection rates between days 100 and 365 after allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 2000;96:3290-3.
37. Wingard JR. Fungal infections after bone marrow transplant. *Biol Blood Marrow Transplant.*, 1999; 5: 55-68.
38. Ribaud P, Chastang C, Latge JP, et al. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.*, 1999; 28: 322-330.
39. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.*, 1999; 12: 310-350.
40. Mehrad B, Moore TA, Standiford TJ. Macrophage inflammatory protein-1 is a critical mediator of host defense against invasive aspergillosis in neutropenic hosts. *J Immunol.* 2000; 165: 962-968.
41. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2001;344:175-81.
42. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: A report from the Societe Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 537-546.

43. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood*. 2000; 95: 3702-3709.
44. Shaughnessy PJ, Kissack B, Bickford DJ, et al. Correlation of CD34 percentage and volume of bone marrow collected for allogeneic bone marrow harvest [abstract]. *Blood*., 1999; 94: 323a.

### Legenda das Tabelas

**Tabela 1** - Características dos pacientes, das doenças, dos doadores e do transplante nos 212 pacientes analisados

**Tabela 2** - Variáveis incluídas nas análises multivariadas para cada desfecho

**Tabela 3** - Análise multivariável da recuperação hematopoética, infecção fúngica, mortalidade relacionada ao transplante e sobrevida global

## Legenda das Figuras

- Figura 1** - Incidência cumulativa da recuperação hematopoética de acordo com a dose de células CD34: recuperação de A) neutrófilos, B) neutropenia secundária, C) monócitos, D) linfócitos, E) hemoglobina e F) plaquetas
- Figura 2** - Incidência cumulativa de infecção fúngica invasiva no dia 180 de acordo com a dose de células CD34
- Figura 3** - Incidência cumulativa de mortalidade relacionada ao transplante no dia 180 (A) e estimativa por Kaplan Meier da sobrevivência global (B) de acordo com a dose de células CD34

**Tabela 1** - Características dos pacientes, das doenças, dos doadores e do transplante nos 212 pacientes analisados

Características	Mediana (intervalo) N (%)
<b>Receptor:</b>	
Idade, anos	31 (3,3 – 55,8)
Peso, kg	64 (13,5 – 100)
Sexo feminino	82 (38,7%)
Crianças ( $\leq$ 15anos)	45 (21,2%)
Sorologia CMV positiva	139 (65,6%)
Transplante autólogo/alogênico prévio	4 (1,9%) / 0
<b>Doença de base:</b>	
Leucemia crônica*	56 (26,4%)
Leucemia aguda**	87 (41,0%)
Outras doenças malignas***	33 (15,6%)
Doenças benignas****	36 (17,0%)
Estágio avançado (para doenças malignas) Avançado*****	27 (12,7%)
<b>Doador:</b>	
Idade, anos	30 (1,2 – 64,9)
Sexo feminino	88 (41,5%)
Sexo semelhante	96 (45,3%)
Doador F receptor M	61 (28,8%)
Compatibilidade ABO	149 (70,3%)
Incompatibilidade maior ABO	37 (17,4%)
Sorologia CMV positiva	108 (50,9%)
Profilaxia DECH aguda:	
Ciclosporina + metotrexato	174 (82,2%)
Ciclosporina + metotrexato + outro	23 (10,8%)
Ciclosporina + corticoíde	15 (7,1%)
<b>Transplante:</b>	
Condicionamento:	
Baseado em irradiação	86 (40,6%)
TBI + Cy $\pm$ outros	38
TBI + Mel $\pm$ outros	42



TAI + Cy em baixas doses	6
Baseado em quimioterapia	126 (59,4%)
Bu + Cy	76
Bu + Cy + VP16	24
Cy	21
Bu + outros	5
NC, $10^8$ /kg	2,4 (0,28 – 5,97)
CD34, $10^6$ /kg	3,7 (0,07 – 18,7)
CFU-GM, $10^5$ /kg, n = 162	0,5 (0,03 – 7,7)
CD3, $10^8$ /kg, n = 67	2,3 (0,25 – 7,32)
NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg	111 (52,4%)
CD34 $\geq 3,0 \times 10^6$ /kg	142 (67,0%)
Fatores de crescimento (até D+7)	13 (6,1%)

\* 55 leucemias mielóides crônicas (LMC): 37 em primeira fase crônica (FC), 5 em segunda FC, 11 em fase acelerada e 2 em crise blástica; 1 leucemia linfóide crônica.

\*\* 45 leucemias linfóides agudas (LLA): 27 em primeira remissão completa (CR1), 6 em CR2, 3 em CR3+, e 9 em recidiva/refratariedade (REL); 42 leucemias mielóides agudas (LMA): 31 em CR1, 7 em CR2 e 4 em REL.

\*\*\* 14 linfomas não Hodgkin (LNH), 12 síndromes mielodisplásicas (SMD), 7 outras doenças mieloproliferativas.

\*\*\*\* 23 aplasias medulares severas, 7 anemias de Fanconi, 4 hemoglobinúrias paroxísticas noturnas, 1 anemia diseritropoética congênita, 1 trombastenia de Glanzmann.

\*\*\*\*\* Estágio avançado: LMC em crise blástica, LMA/LLA em recidiva ou refratariedade, LNH em recidiva resistente ou não tratada, SMD classificada como anemia com excesso de blastos ou excesso de blastos em transformação e leucemia aguda secundária (Modificado da classificação do IBMTR).

TBI = irradiação corporal total, TAI = irradiação toraco-abdominal, Bu = busulfan, Cy = ciclofosfamida, Mel = melfalan, VP16 = etoposídeo, NC= células nucleadas, CFU-GM = unidades formadoras de colônias – granulócitos e macrófagos.

**Tabela 2** - Variáveis incluídas nas análises multivariadas para cada desfecho

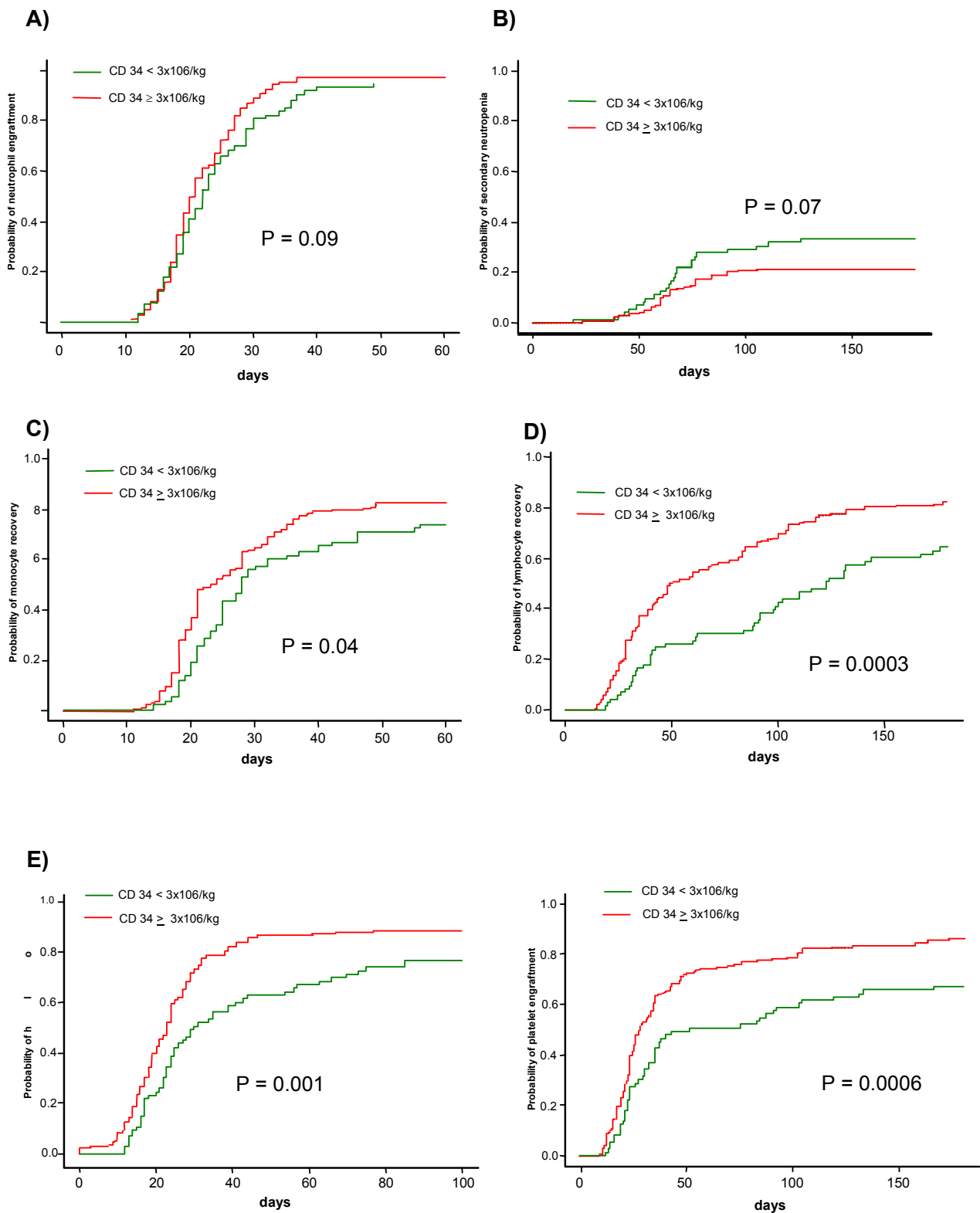
Desfechos	Variáveis
Recuperação de neutrófilos	BuCy, CD34 $\geq 3,0 \times 10^6$ /kg, doador feminino e receptor masculino, receptor feminino, condicionamento baseado em irradiação, NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg
Neutropenia secundária	Estágio avançado, BuCy, CD34 $\geq 3,0 \times 10^6$ /kg, receptor feminino, NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg, semelhança de sexo
Recuperação de monócitos	BuCy, CD34 $\geq 3,0 \times 10^6$ /kg, receptor feminino, condicionamento baseado em irradiação, peso
Recuperação de linfócitos	Leucemia aguda, idade, idade do doador, CD34 $\geq 3,0 \times 10^6$ /kg, leucemia crônica, doador feminino e receptor masculino, NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg, sorologia CMV positiva, peso
Recuperação de hemoglobina	CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg, leucemia crônica, NC $\geq 2,4 \times 10^8$ / kg, semelhança de sexo
Recuperação de plaquetas	CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg, receptor feminino, estágio avançado, condicionamento baseado em irradiação, malignidade, NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg
Infecção fúngica invasiva	Leucemia aguda, estágio avançado, idade, CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg, idade doador, NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg, outras malignidades
Mortalidade relacionada ao transplante	Incompatibilidade maior ABO, estágio avançado, idade, CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg, idade e sexo do doador, condicionamento baseado em irradiação, NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg, peso
Sobrevida global	Incompatibilidade maior ABO, estágio avançado, idade, BuCy, CD34 $> 3 \times 10^6$ /kg, sorologia CMV positiva do doador, idade do doador, receptor feminino, condicionamento baseado em irradiação, malignidade, NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg, outra malignidade, peso

BuCy = Busulfan associado a ciclofosfamida; NC = células nucleadas; CMV = citomegalovírus.

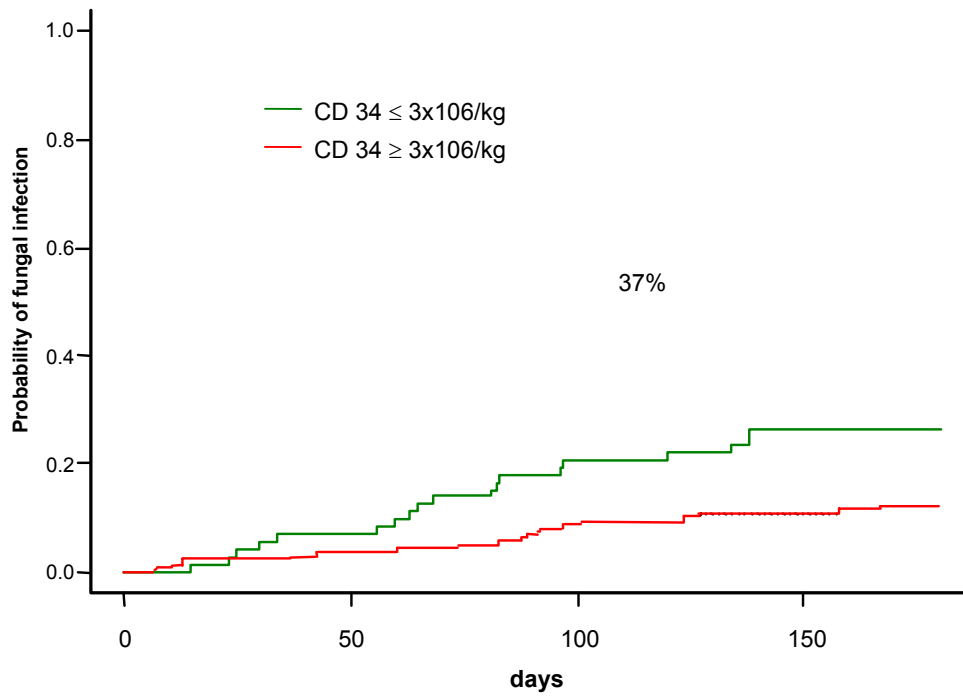
**Tabela 3** - Análise multivariável da recuperação hematopoética, infecção fúngica, mortalidade relacionada ao transplante e sobrevida global

	Hazard Ratio (Intervalo de confiança-95%)	P
<b>Pega de neutrófilos</b>		
Receptor sexo feminino	1,72 (1,25-2,37)	0,01
NC $\geq 2,4 \times 10^8$ /kg	1,37 (1,01-1,85)	0,04
<b>Neutropenia secundária</b>		
Receptor sexo feminino	2,12 (1,09-4,12)	0,03
Estágio avançado	0,51 (0,28-0,94)	0,03
CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg	0,60 (0,35-1,00)	0,05
<b>Recuperação de monócitos</b>		
Receptor sexo feminino	1,46 (1,05-2,03)	0,03
CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg	1,47 (1,07-2,03)	0,02
<b>Recuperação dos linfócitos</b>		
Idade doador*	0,98 (0,97-1,00)	0,01
Sorologia CMV positiva	1,62 (1,15-2,28)	0,006
CD34 $\geq 3,0 \times 10^6$ /kg	1,70 (1,20-2,41)	0,003
<b>Recuperação de hemoglobina</b>		
Leucemia crônica	1,43 (1,05-1,96)	0,02
CD34 $\geq 3 \times 10^6$ /kg	1,77 (1,31-2,39)	0,0002
Semelhança de sexo	0,74 (0,55-0,98)	0,04
<b>Recuperação de plaquetas</b>		
Estágio avançado da doença	0,51 (0,30-0,86)	0,01
Receptor feminino	1,37 (1,01-1,87)	0,01
CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg	1,98 (1,41-2,77)	0,00008
<b>Infecção fúngica</b>		
Estágio avançado da doença	2,49 (1,12-5,57)	0,03
CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg	0,41 (0,21-0,79)	0,008
<b>Mortalidade relacionada ao transplante</b>		
Idade do receptor	1,04 (1,02-1,06)	0,0004
Estágio avançado da doença	2,61 (1,37-4,98)	0,004
Doadora feminina	0,52 (0,29-0,95)	0,03
CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg	0,54 (0,32-0,94)	0,03
<b>Sobrevida global</b>		
Idade do receptor	1,03 (1,02-1,04)	0,001
Estágio avançado da doença	2,53 (1,50-4,25)	0,0005
Receptor feminino	0,57 (0,36-0,89)	0,01
CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg	0,55 (0,36-0,85)	0,006

\* variável contínua. CMV = citomegalovírus.

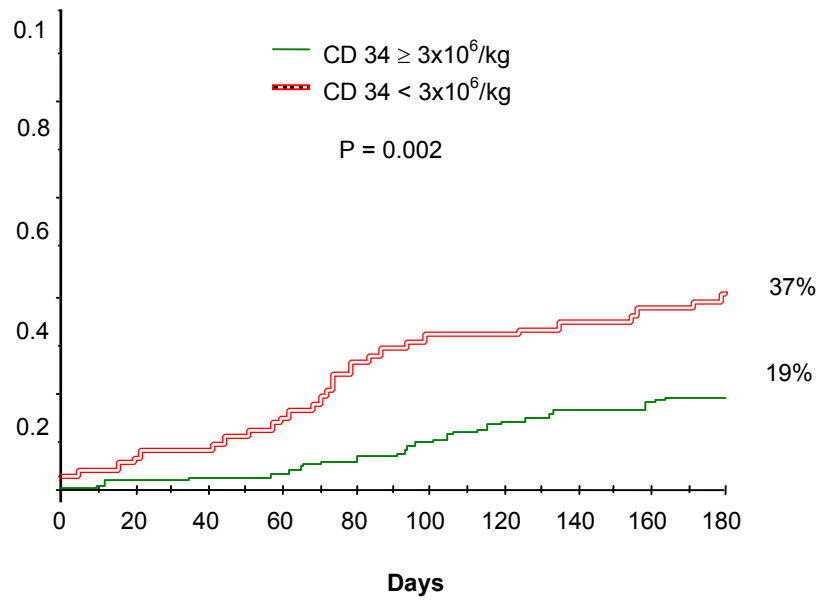


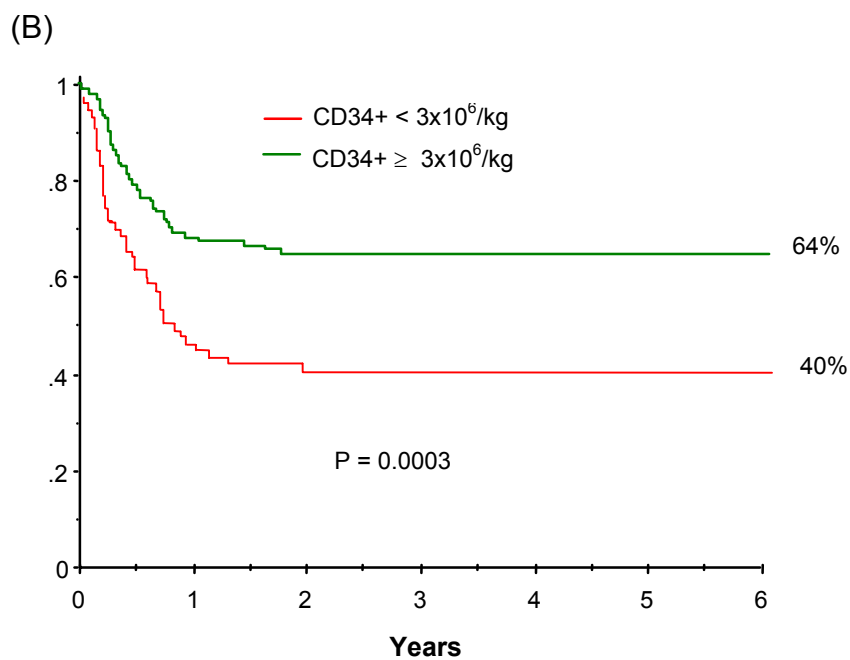
**Fig. 1** - Incidência cumulativa da recuperação hematopoética de acordo com a dose de células CD34: recuperação de A) neutrófilos, B) neutropenia secundária, C) monócitos, D) linfócitos, E) hemoglobina e F) plaquetas



**Fig. 2** - Incidência cumulativa de infecção fúngica invasiva no dia 180 de acordo com a dose de células CD34

(A)





**Fig. 3** - Incidência cumulativa de mortalidade relacionada ao transplante no dia 180 (A) e estimativa por Kaplan Meier da sobrevida global (B) de acordo com a dose de células CD34