

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
-RENORBIO-
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA



MARCO AURELIO SALVINO DE ARAUJO



Salvador-Bahia

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-UFBA

-RENORBIO-

DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA



Anemia Aplásica no Estado da Bahia: Estudo Clínico-
Epidemiológico, e Investigação de Biomarcadores associados ao
diagnóstico e ao prognóstico da doença.

MARCO AURELIO SALVINO DE ARAUJO

TESE APRESENTADA e APROVADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE

DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA

*PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO -RENORBIO-
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA (PONTO FOCAL)
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARA (SEDE)
(16.09.2013)*

ORIENTADOR: PROF. ROBERTO JOSE MEYER NASCIMENTO

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

A663 Araújo, Marco Aurélio Salvino de
Anemia aplásica no Estado da Bahia: estudo clínico-epidemiológico, e investigação de biomarcadores associados ao diagnóstico e ao prognóstico da doença / Marco Aurélio Salvino de Araújo. - Salvador, 2013.
140 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Jose Meyer Nascimento.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Anemia Aplásica. 2. Biomarcadores. 3. Citocinas. 4. HLA. 5. Polimorfismo. I. Nascimento, Roberto Jose Meyer. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.155.194

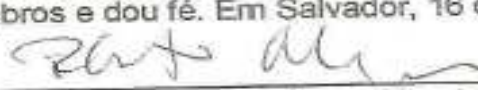
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia


Universidade Federal da Bahia-UFBA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Av. Miguel Calmon, s/n – Vale do Canela
40110-100, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: renorbio@ufba.br


ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese do Doutorado Marco Aurélio Salvino de Araújo. Aos dezesseis dias do mês de setembro do ano de dois mil e treze, às quatorze horas no Auditório Ophélia Gaudin no terceiro andar no Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA) se reúne em sessão pública a Banca Examinadora de Defesa de Tese composta pelos Professores: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento, como orientador, Profa. Dra. Maria da Glória Bomfim Arruda, Profa. Dra. Igmaracyra Barreto de Oliveira Araújo, Profa. Dra. Songeli Menezes Freire, Prof. Dr. Milton Ricardo Abreu Roque perante o qual o Doutorando Marco Aurélio Salvino de Araújo, regularmente matriculado no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Bahia, defendeu, para preenchimento do requisito de doutor, sua Tese intitulada “Anemia Aplásica no Estado da Bahia: Avaliação Clínica, Epidemiológica e Investigação de Biomarcadores associados ao diagnóstico e prognóstico da doença”. A defesa da referida tese ocorreu, das quatorze horas às 17h, tendo o Doutorando sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da Banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o Doutorando Aprovado por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito Satisfatório.

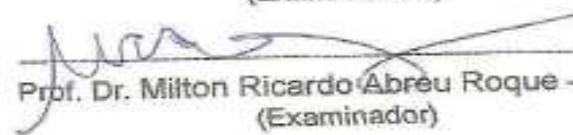
Eu, Roberto José Meyer Nascimento, que presidi a Banca de Tese, assino a presente ata juntamente com os demais membros e dou fé. Em Salvador, 16 de setembro de 2013.


Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento – UFBA
(Orientador)


Profa. Dra. Maria da Glória Bomfim Arruda – UFBA
(Examinadora)


Profa. Dra. Igmaracyra Barreto de Oliveira Araújo
(Examinadora)


Profa. Dra. Songeli Menezes Freire – UFBA
(Examinadora)


Prof. Dr. Milton Ricardo Abreu Roque – UFBA
(Examinador)

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia-UFBA
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
Av. Miguel Calmon, s/n – Vale do Canela

40110-100, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: renorbio@ufba.br

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: MARCO AURÉLIO SALVINO

TÍTULO DO PROJETO: "Anemia Aplásica no Estado da Bahia: Avaliação Clínica Epidemiológica e Investigação de Biomarcadores associados ao diagnóstico prognóstico da doença".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento – UFBA
(Orientador)

Profa. Dra. Maria da Glória Bomfim Arruda - UFBA
(Examinadora)

Profa. Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo - UFBA
(Examinadora)

Profa. Dra. Songeli Menezes Freire – UFBA
(Examinadora)

Prof. Dr. Milton Ricardo Abreu Roque - UFBA
(Examinador)

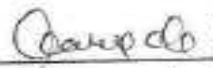
CONCEITO

ASSINA

Satisfatório



Satisfatório



Satisfatório



Satisfatório



Satisfatório



DATA DA DEFESA DE TESE: 16 de setembro de 2013

HORÁRIO: 14hs

LOCAL: Auditório III no 2º andar

ICS/UFBA

Banca Examinadora da Tese defendida publicamente e aprovada em 16.09.13:

Prof. Milton Roque

Prof. Maria da Gloria Bomfim

Prof. Songeli Menezes Freire\

Prof. Iguaracyra Araujo

Prof. Roberto Meyer

*A MINHA FAMÍLIA, PELO AMOR INCONDICIONAL:
MEU PAI ARI, MINHA MÃE HILDA E MINHA IRMÃ PRI*

CONTEÚDO

CONTEÚDO	8
LISTA DE ABREVIACÕES.....	11
1. RESUMO.....	13
2.INTRODUÇÃO.....	16
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA APLÁSICA SEVERA	16
1.2 ANEMIA APLASICA ADQUIRIDA (AAA) FISIOPATOLOGIA - O ESTADO DA ARTE.....	19
1.2.1 FATORES ANTIGÊNICOS.....	22
1.2.2 FATORES IMUNOGENÉTICOS.....	28
1.2.3 FATORES MICROAMBIENTAIS.....	37
1.2.4 AAA E OUTRAS ASSOCIAÇÕES.....	38
1.2.4.1 HEMOGLOBUINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA	38
1.2.4.2 GRAVIDEZ	39
1.2.4.3 AAA ASSOCIADA À HEPATITE	39
1.3 DIAGNÓSTICO DA AAA	40
1.4 TRATAMENTO DA AAA.....	41
1.5 FATORES PROGNÓSTICOS	42
2 JUSTIFICATIVA / INOVACAO.....	44
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	45
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	45
4 MATERIAIS E METODOS	46
4.1 DESENHO DO ESTUDO	46
4.2 CASUÍSTICA	47
4.3. METODOLOGIA.....	47
5 RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
7 REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICES I - FICHA DE COLETA DE DADOS.....	124
APÊNDICE II - FLUXOGRAMA DE DECISÃO DE TRATAMENTO DA AAA..	127
APÊNDICE III – PROTOCOLO DE TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR DA AAA	128

AGRADECIMENTOS

Pouco antes de prestar a prova para inscrição no doutoramento li um texto pouco motivador que se chamava *“10 motivos para não fazer um doutorado”* e o texto dizia que com o doutorado: *“você se afastaria da família e dos amigos; se tornaria cada dia mais alienado e com menor noção do macrocosmos; leria menos livros e veria menos filmes; ficaria mais chato; não sobraria tempo algum para cuidar de si, teria fortes dores nas costas. E terminava dando o golpe de misericórdia: ninguém lerá sua tese, e, a vida não volta atrás”*.

Não desisti, as costas doem até hoje, mas descobri que quem escreveu o texto, deve tê-lo feito, assim, aparentemente desmotivador, propositalmente. É incrível como às vezes, a dificuldade pode ser o maior estímulo ao desafio. Viver é buscar diariamente uma solução. Viver é aprender. Aprender na sua máxima amplitude. Sem perder de vista a estrada bela que nos conduz a um destino, com os olhos bem abertos, o período do doutorado, foi para mim, uma grande lição. Meus pais e amigos nunca se afastaram de mim, nem por um dia.

De acordo com Simone de Beauvoir, todas as vitórias ocultaram uma abdicação. Nenhuma delas, na história de nossos ancestrais aconteceu apenas por inspiração, sem transpiração. É nosso! Da nossa espécie. Descobri que Chaplin, o grande artista poeta, tinha razão quando escrevia que a menor distancia entre você é o sucesso para qualquer coisa que desejar, é a persistência.

O aprendizado e o conhecimento nos tornam responsáveis. Duro para quem assume o fardo, mas bom para aquele que agora tem um cuidador. Nós que trabalhamos com a saúde, temos este fardo. Não mais pesado que nossas forças. Pesados. Mas que belo é ter o fardo para o cuidar, do que ter o pesar de ser cuidado.

Muitos me seguraram nas horas difíceis, outros me estimularam ladeira acima. Uns me ajudaram diariamente, diretamente. Outros suavemente passaram. Às vezes uma gota no deserto pode fazer milagres, e a pobre da pequena gota nem imagina.

Agradeço a Deus, por num país onde a maior parte das crianças nasce em berço simples ou sem ele, ter tido a joia de nascer em uma família que me pode oferecer de tudo.

A minha família, tão amada. Meus pais, que ensinaram não através de palavras (o caminho mais curto), mas através do árduo caminho do exemplo diário. Ensinaram o que é amar. Se tenho perseverança, é graças a eles. A minha irmã, que me mostrou que não se pode desistir jamais, que somos capazes de tudo. Existe uma mão para se agarrar, até na mais profunda

tempestade. A toda minha família, sobretudo minhas tias Marli e Sueli, que sempre, incondicionalmente, estiveram do meu lado.

Ao meu orientador e amigo, Prof. **Roberto Meyer**, pessoa magna do início ao fim deste doutorado. No estímulo, no apoio. De compreensão plena. Apoiando-me em todas as atividades de que participei até mesmo aquelas que poderiam prejudicar o andamento do doutorado. A pessoa que apostou em mim, e me inseriu na Universidade Federal da Bahia, e logo me estimulou tanto para a minha entrada na pós-graduação.

A Prof^a. **Glória Bomfim**, mestra, amiga, minha Patronesse, exemplo de profissional. Agradeço por tanto me estimular a lutar para ser professor e doutor na primeira universidade do país. Professora que me ensinou a ter orgulho do que se faz. Me ensinou a amar a Universidade e o que ela significa: o ensino, semear. Ensinou que o bom professor, o faz por amor. Que o presente se fez através do ensino do mais jovem.

A toda equipe médica de hematologia e transplante de medula óssea, do Hospital das Clínicas- CTMO: que me apoiaram e apoiam diariamente. Me estimulam, me inspiram, atenuam meus defeitos, acreditam nas minhas qualidades.

A toda Equipe hemato multi do HC UFBA- CTMO: sem esta equipe, quase uma segunda família: Todos os funcionários da assistência em enfermagem e administrativa, farmácia e multi especialidades, que me ensinam, que o paciente vai muito além de seu problema medico. Que saúde não é a ausência de uma patologia, mas um bem estar amplo, multi fatorial.

Marilda Gonçalves, Fiocruz, amiga, professora, coautora, motivadora. Fonte inesgotável de energia, exemplo de pessoa, profissional. Sem ela o trabalho não existiria, por diversos motivos.

Prof.^a. Eliane Menezes, e equipe Imunogenética do HC-UFBA, pelo auxílio com dados e conhecimento na área do HLA, um dos temas principais do doutoramento. A Prof Denise Viola, pelos ensinamentos em geoestatística.

A fundação Hemoba em nome de Anelisa, pacientes e equipe multi: que me acolheram mais uma vez naquela, que foi minha primeira casa aqui no Estado quando cheguei. O bom filho ao lar retorna. Aos pacientes que na instituição seguem, e que me inspiram seguir investigando, estudando e aprendendo sobre o motivo de meu doutorado (anemia aplásica).

Aos meus **amigos e colegas do Hospital São Rafael**, pela compreensão com a missão do doutorado, pelo apoio, estímulo, convictos da importância do doutorado, mesmo que lhe aumentassem trabalho. Obrigado por fazer parte deste time maravilhoso.

À minha **Bruna**, pelo apoio, pela ajuda com traduções, pelas correções de texto, pelas sugestões, pela paciência, pelo carinho num momento de grande apreensão, por me acalmar nos momentos de incertezas.

LISTA DE ABREVIações

UFBA-Universidade Federal da Bahia

AAA- Anemia Aplásica Adquirida

AAAH - anemia aplasia associada a hepatite

AAS – Anemia Aplásica Severa

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa

TMO- Transplante de Medula Óssea

AUTO TMO- Transplante de Medula Óssea Autólogo

ALO TMO – Transplante de Medula Óssea Alogênico

AF – Anemia de Fanconi

APCs – do inglês, *Antigens presenting cells* – Células apresentadoras de antígenos

APS – do inglês *amoniium persulfate* – persulfato de amônio

ATG – Antitimoglobulina

CSA – Ciclosporina

CTLA4 - linfócito T citotóxico 4

CY – Ciclofosfamida

DDT - Diclorodifeniltricloroetano)

DECHa – Doença do enxerto contra hospedeiro aguda

DECHc – Doença do enxerto contra hospedeiro crônica

EA - espondilite anquilosante

EBV - vírus Epstein-Barr

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetracético

GPI - glicosilfosfatidilinositol

HPN – Hemagobinúria Paroxística Noturna

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN-G - Interferon Gamma

IS – Imunossupressão

Aa – aminoácidos

NF- κB - fator nuclear – κB

NK - células natural killer

LT - linfócitos T

STAT4 – fator de ativador da transcrição 4

SG – sobrevivida global

TNT – trinitrotolueno

VCM - volume corpuscular médio

1. RESUMO

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO-Universidade Federal da Bahia - UFBA, no dia 16.09.2014.

“Anemia Aplásica no Estado da Bahia: Estudo Clínico-Epidemiológico, e Investigação de Biomarcadores associados ao diagnóstico e ao prognóstico da doença”

Palavras chaves: 1. Anemia Aplásica. 2. Biomarcadores. 3. Citocinas. 4. HLA. 5. Polimorfismo.

RESUMO

Introdução: A anemia aplásica é uma rara e grave doença caracterizada por pancitopenia. A forma mais frequente é a adquirida, e na sua maioria das vezes de origem idiopática. Doença imunomediada de fisiopatologia muito mais conhecida pela sua resposta ‘as terapias imunossupressoras do que por estudos capazes de entender sua complexidade. Sabe-se que a doença pode ser desencadeada por algum “gatilho”, entretanto necessita de um hospedeiro com características imunológicas de forte predisposição ao seu desenvolvimento. Destaca-se como fator associados a doença a presença de alguns antígenos HLA, polimorfismo de alguns genes, presença de clone HPN, encurtamento dos telômeros medulares, etc.

Fatal se não tratada, hoje a doença possui prognóstico muito bom quando tratado precoce e adequadamente com imunossupressores ou transplante alogênico de medula óssea. Dada a gravidade e raridade da doença, estudos clínicos em países em desenvolvimento são muito poucos. Sua incidência varia de, ao redor de 1 a 4 casos /milhão hab/ano na Europa e América do Norte, até 5-9 casos/milhão/ano na Ásia, motivo pelo qual a maioria dos estudos são chineses e japoneses. Entretanto, questionamos se os fatores epidemiológicos, clínicos e laboratoriais no Brasil, sobretudo na Bahia, são os mesmos descritos pela literatura mundial; se existem associações entre eles e a doença; se temos em nossa população fatores preditores de resposta ao tratamento imunossupressor diferentes da literatura.

Materiais/Métodos: Retrospectivamente, analisamos mais de 215 pacientes em relação aos seus dados clínico-epidemiológicos, e 100 pacientes em relação as respostas ao tratamento submetido, no período de 2000 até 2013, no HUPES/Universidade Federal da Bahia referenciados pela HEMOBA e rede estadual de saúde.

Resultados: A idade média dos pacientes foi de 23 anos, com 80% dos casos diagnosticados abaixo dos 45 anos, e composta por homens em 56% das vezes. 30% dos pacientes eram de Salvador, capital. A maioria dos casos 70%, eram idiopáticos, Dois terços dos casos eram de formas severas. Não houve nenhum padrão de distribuição geo-espacial dos casos de AA no estado da Bahia.

Em relação ao HLA, o HLADR15 foi o mais associado a doença como fator de risco, sendo presente em 42% dos casos (24% controle-OR 2,2). O HLAB15 foi o mais importante fator protetor da doença (6% versus 24% controle-OR 0,2). Houve maior significância destes achados na faixa etária de 15-35 anos. Descrevemos pela primeira vez na literatura o sinergismo entre estes HLAs, demonstrando que o B15 perde parte de seu efeito protetor na presença de DR15+, e o B15+ se torna ainda mais protetor quando em presença de DR15-.

O tratamento mais utilizado (70%) em nosso serviço foi baseado em ciclosporina, sendo na grande maioria dos casos, em monoterapia. Foi realizado Transplante Alogênico de Medula Óssea em 24% dos casos. As curvas de sobrevida global aos 24 e aos 60 meses, comparando tratamento com TMO ou com CSA não mostrou diferença significativa. A taxa de SG aos 24 meses foi ao redor de 80% e de 70% aos 5 anos (60 meses) para ambos os grupos. Achados semelhantes às curvas da literatura internacional, mesmo com o uso de CSA em associação com ATG.

Houve diferença muito significativa entre casos de AA muito severa (40% de sobrevida global) versus não severo/severo (90%) na análise de Sobrevida Global aos 24 meses. Sexo (masculino/feminino), presença de HLADR15(positivo ou negativo), proveniência (capital ou interior) e causa da AA (idiopática ou secundária) não mostraram interferir na resposta de sobrevida global.

Conclusão: Nesta ampla análise, descrevemos pela primeira vez na região nordeste do País, importantes dados clínico epidemiológicos ligados a anemia aplásica. Novas perspectivas com relação ao HLA e a doença foram descritas. A monoterapia baseada com ciclosporina é uma excelente e disponível terapia em países em desenvolvimento.

2. INTRODUÇÃO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA APLÁSICA SEVERA

A anemia aplásica (AA) é uma doença rara e grave caracterizada por hipocelularidade da medula óssea (fig.1). O conceito da anemia aplásica foi descrito pela primeira vez por *Sir Paul Ehrlich*, na Alemanha em 1888, quando o médico vencedor do prêmio Nobel da medicina reportou o caso clínico de óbito devido falência medular de uma paciente grávida. Entretanto, esta patologia somente foi nomeada como anemia aplásica por *Sir Chauffard* a partir de 1904. [1, 2]

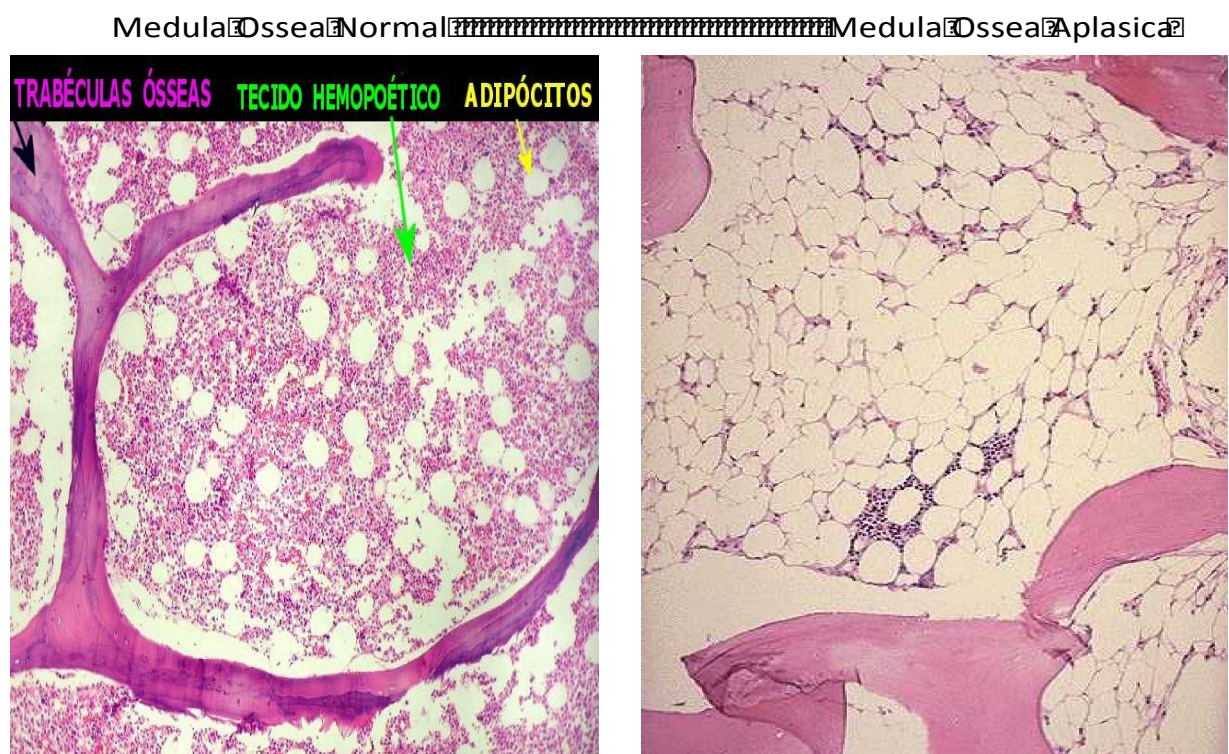


Figura 1. Histologia da medula óssea normal e aplásica.

A incidência da AA é bastante variável entre diferentes regiões do mundo. Estudos populacionais demonstram que a doença é mais comum no oriente do que no ocidente. [3-7]

QUADRO 1 - COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DA ANEMIA APLÁSTICA EM DIFERENTES REGIÕES

REGIÕES	PERÍODO	COEF. INCIDÊNCIA ANUAL/1.000.000 HAB.
US	1942-1945	0,4 - 1,8
Califórnia	1963-1964	5,2
Suécia	1964-1968	7,8
Israel	1961-1965	7,8
Japão	1970-1973	13,9
Baltimore	1970-1978	6,1
UK	1985	2,3
Dinamarca	1967-1982	2,2
Europa	1980-1984	2,2
Buenos Aires	1966-1977	6,0
França	1984-1987	1,4
China	1986-1988	7,4

FONTE: YOUNG; ALTER, 1994b, p.25

Figura 2. Coeficiente de incidência anual/1.000.000 habitantes por período em diferentes regiões. [8]

Desde a década de 90, está sendo realizado um estudo caso-controle na Tailândia sobre fatores de risco para avaliar anemia aplásica e sua incidência, e este grupo demonstrou uma incidência na cidade de Bancoque de 3,9 casos novos em 1.000.000 habitantes por ano [3, 6]. Já no ocidente (Europa e Israel), a taxa foi reduzida com um coeficiente de dois novos casos por milhão de habitantes por ano. [9]

De acordo com um estudo multicêntrico latino, a incidência na região demonstrada foi de 1,6 casos em um milhão de habitantes por ano, sendo questionado pelo próprio autor sub - diagnóstico nestas regiões e países em desenvolvimento[3-5, 7, 8, 10-19]

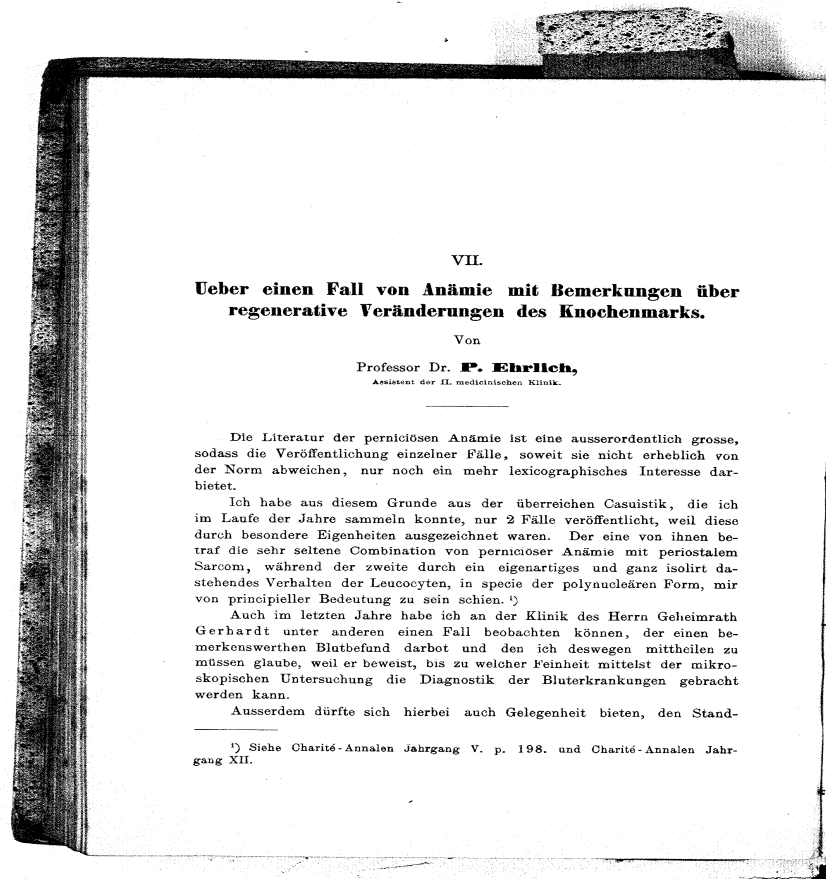


Figura 3. Livro de Paul Eherlich de 1888 com a descrição da anemia aplásica.

No Brasil, existem dados epidemiológicos de apenas uma única publicação avaliando a região do Paraná. O estudo reportou uma incidência de 2,4 em 100.000 habitantes/ano. Entretanto, não existem resultados de estudos epidemiológicos da AAS de outras regiões incluindo a região nordeste do Brasil. [4]

A AAS pode ser congênita e adquirida sendo a congênita associada a doenças constitucionais, ocorrendo com maior frequência em pacientes autossômicos recessivo, como anemia de Fanconi e Disceratose congênita. Enquanto isso, a forma adquirida ocorre de forma idiopática [15]. Em 30% dos

casos de AAS, pode ser encontrado um fator causal suspeito desencadeador da doença como medicamentos, pesticidas, e agentes infecciosos ,etc [20-26].

A história natural da doença foi modificada radicalmente nas últimas décadas com a introdução dos imunossupressores e com o transplante de medula óssea [27, 28]. Há 50 anos, a doença passará de fatal, para apresentar excelentes resultados clínicos com taxa de sobrevida global em 5 anos superior a 85% na maioria das séries [27-29].

1.2 ANEMIA APLASICA ADQUIRIDA (AAA) FISIOPATOLOGIA - O ESTADO DA ARTE

Historicamente, AAA tem sido fortemente associada à exposição a medicamentos e substâncias químicas presentes no ambiente, dando a doença um impacto social desproporcional à sua rara incidência. Acredita-se também que há uma associação com numerosas e múltiplas diversas possíveis causas desde produtos químicos e medicamentos, gestação e doenças como hepatite e doenças vasculares do colágeno (por exemplo, fasciíte eosinofílica). Tais fatos levam a acreditar que a AAS apresenta numerosos e diferentes mecanismos [30].

Desde 1897 tem-se o conhecimento de que substâncias tóxicas agressoras ao sistema hematológico provocam alterações sanguíneas, quando foi descrito o primeiro caso de AAA associado ao benzeno. Tais conhecimentos tiveram um grande impulso após a I Guerra Mundial, quando se verificou a ação de gases tóxicos sobre o sangue[7]. As drogas e os agentes químicos historicamente formam o grupo etiológico mais citado em séries clínicas e estudos epidemiológicos. A lista de agentes que podem causar AAA, tanto os

químicos quanto os biológicos é longa e o mecanismo da aplasia ainda não está bem esclarecido. É provável que para o desencadeamento da AAA ocorra um efeito tóxico direto de algumas dessas substâncias sobre as células hematopoiéticas geneticamente receptivas.

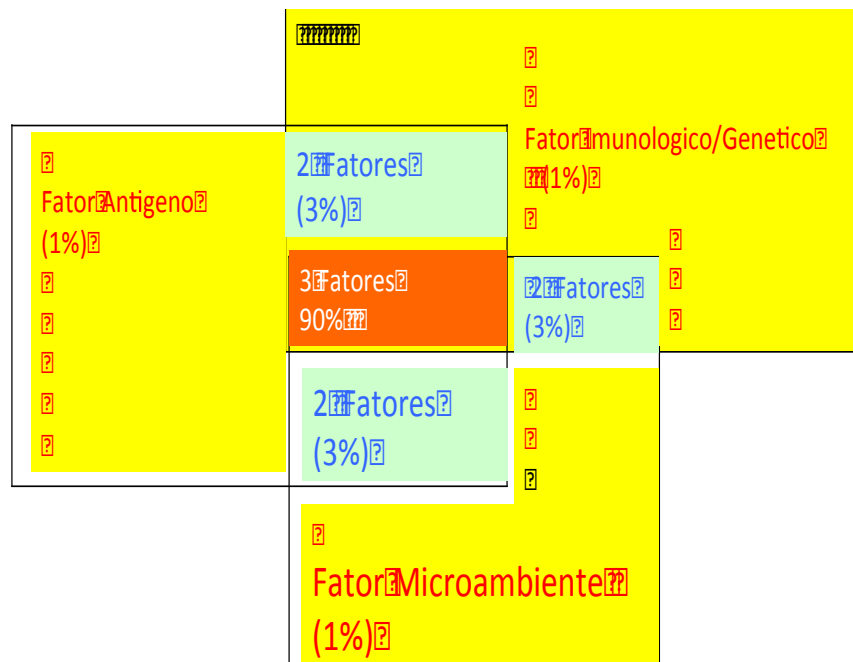
Originalmente pensou-se que a AAA resultava do efeito tóxico direto em células tronco hematopoiéticas que levavam a uma diminuição do seu número. Mathé e colaboradores, no final dos anos 60 foram um dos primeiros a postularem uma base autoimune para essa doença. Nesse estudo, após a administração de globulina antitimócito (ATG) para o tratamento imunossupressor, medulas ósseas de doadores incompatíveis foram transplantadas em pacientes com AA. Foi observado que, embora a medula transplantada não tenha sido enxertada, houve uma recuperação autóloga da hematopoese em alguns pacientes. Tais achados sugerem que os pacientes com AA mantiveram células tronco hematopoiéticas que tiveram seu crescimento e diferenciação suprimidas pelo sistema imune [31]. Em uma análise de transplantes feitos entre gêmeos idênticos para AA foi observado pelo *International Bone Marrow Transplant Registry* evidências de uma etiologia autoimune para a maioria dos pacientes. Em 70% dos pacientes, a tentativa de tratamento da AA através da transfusão simples de medula óssea a partir de um gêmeo idêntico, falhou a reconstituição da hematopoiese [32]. Com a repetição do procedimento após um regime de condicionamento, com altas doses de ciclofosfamida capaz de eliminar a autoimunidade, foi bem sucedido na maioria dos pacientes [32, 33]

Na maioria dos casos, AA é uma doença imuno-mediada, evidenciada pela responsividade da doença a terapias imunossupressivas. É observado na

maioria dos pacientes uma melhora hematológica após a depleção de células T por ATG; a recidiva geralmente também responde à ATG e não é frequente a dependência da ciclosporina em doses baixas para manutenção de um hemograma adequado. A atribuição do mecanismo imunológico à AAA tem se intensificado uma vez que o uso de imunossupressores vem aumentando assim como a proporção de resposta a esse tratamento.

Alguns autores questionam um processo fisiopatológico não-imune quando se observa uma falta de resposta à imunossupressão. Entretanto, outros a atribuem a uma grave depleção de células-tronco anterior, ou seja, esgotamento do repertório de células tronco, ou até mesmo a mecanismos imunológicos não suscetíveis à terapias atuais[34].

Em resumo, a figura 4 demonstra hipoteticamente que para o aparecimento da AAA é necessário, em geral, mais de um fator causal. Raramente um único fator desencadeante é suficiente para o aparecimento do quadro clínico como é conhecido. Provavelmente é necessária a coexistência de um fator gatilho (fator antigênico) em um indivíduo com predisposição imunológica genética ou circunstancial (fator imunológico) em um micro ambiente medular predisponente para que a doença apareça. Quanto maior o número de fatores presentes, maior a chance de aparecimento da doença. Nenhum fator isolado seria capaz de deflagrar a doença imunomediada.



Mecanismo Multifatorial Fisiopatológico Hipotético: o surgimento da AAA se associaria a fatores antigenicos precipitantes, associados a um hospedeiro com fatores imunogenicos predisponentes, na vigencia de micro ambiente favoravel para o deselvolver da doenca. Quanto maior o numero de fatores presentes, maior a chance do aparecimento da AAA.

(Fatores antigenicos: drogas,virus,substancias, bacterias; Fatores imuno-geneticos: HLA,polimorfismo de citocinas, SNPs, populacoes de linfocitos T;autoanticorpos. Fatores microambientais: telomeros encurtados,etc). Quanto maior o numero de fatores presentes maior seria a chance de se desenvolver a AAA.

Figura 4. Mecanismo fisiopatológico hipotético do desenvolvimento da AAA.

(Salvino.M.A..)

1.2.1 FATORES ANTIGÊNICOS

Os fatores antigênicos desencadeantes da AAA incluem as infecções de vírus e bactérias, substâncias tóxicas e medicamentos.

- Infecções virais e bacterianas

A relação entre hepatite e o subsequente desenvolvimento da anemia aplásica tem sido reportada em diversos estudos de caso e duas grandes revisões na década de 70 enfatizaram essa associação [35, 36] Em muitos casos, a hepatite melhorou ou foi resolvida quando a anemia aplásica foi diagnosticada 4 a 12 semanas depois. Aproximadamente 10% dos casos

ocorreram mais de um ano após o diagnóstico inicial da hepatite e a maioria dos pacientes eram jovens (com idade entre 18 a 20 anos), dois terços eram do sexo masculino e a sobrevida foi curta (10 semanas). A maioria dos casos eram relacionados a hepatite não A, não B e não C, embora hepatite A e B tenha sido implicada na anemia aplásica em um pequeno número de casos. [37, 38] Diversas linhas de evidências indicam que não há associação causal com o vírus da hepatite C, sugerindo que um agente viral desconhecido está envolvido.[22, 39] Em 15 pacientes com anemia aplásica pós-hepatite, não foi encontrada nenhuma evidência para hepatite A, B, C, D, E ou G, vírus transmitido por transfusão ou parvovírus B19 [40]. Diversos estudos sugerem uma relação entre o parvovírus B19 à anemia aplásica, enquanto outros estudos não observaram essa associação [41-43]. Sendo assim, essa relação não foi estabelecida e é provável que o efeito da soronegatividade da hepatite pode ser mediado através de um efeito autoimune da célula T uma vez que há evidências da ativação dessa célula e da elaboração de citocina.[34]

O vírus Epstein-Barr (EBV) também tem sido implicado na patogênese da anemia aplásica, que ocorre dentro de 4 a 6 semanas após a infecção [44, 45]. Em alguns casos, a mononucleose infecciosa é subclínica. O EBV foi detectado em células da medula mas não é totalmente claro se a aplasia da medula resulta de um efeito direto ou de um resposta imunológica do hospedeiro [45].

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) está frequentemente associada com variados graus de citopenia. Em pacientes infectados a hipoplasia medular pode ser resultante da supressão viral e dos medicamentos usados para controlar a replicação viral [46-48]. O herpes vírus

humano 6 também causou aplasia grave subsequente ao transplante de medula para outras doenças.[49]

Entre as etiologias virais já citadas também foram relatadas rubéola, caxumba e dengue [50]. No passado, a AAA foi atribuída à tuberculose, porém essa associação tem sido questionada uma vez que esses pacientes possam ter desenvolvido o quadro de AAA em consequência dos medicamentos tuberculostáticos e não pelo processo infeccioso [51]

- Substâncias tóxicas

O benzeno foi a primeira substância química associada à anemia aplásica, tendo sido observada em estudo realizados antes do século 20 em trabalhadores de fábricas [7, 17, 52, 53]. Em estudos realizados na China, a incidência de anemia aplásica entre trabalhadores foi seis vezes maior do que na população geral.[53]

Os compostos de pesticidas organoclorados e organofosforados têm sido suspeitos de atuarem no desenvolvimento da anemia aplásica [52, 53] e diversos estudos indicaram um aumento do risco relativo, especialmente para exposições agrícolas[6, 54-56] e domésticas. A exposição a essas substâncias como fator desencadeante da anemia aplásica é suspeita devido as relações dose-doença e outros importantes fatores ainda não foram delineados e diversos estudos não encontraram uma associação com exposições ambientais [57, 58]. Os inseticidas DDT (diclorodifeniltricloroetano), lindano e clordano tem sido Associados com casos de anemia aplásica [6, 52]. A exposição prolongada à destilados de petróleo na forma de solvente Stoddard e a

exposição aguda ao tolueno através da prática de inalar cola também tem sido reportada como causa de aplasia medular [59-61]. O explosivo trinitrotolueno (TNT) muito utilizado durante a I e II Guerras Mundiais e cuja absorção ocorre prontamente pela inalação e através da pele, provocou casos fatais de anemia aplásica em trabalhadores expostos à munição [62, 63].

A maioria dos casos de exposição à substâncias tóxicas e a ocorrência de anemia aplásica não foram observados em estudos específicos, mas foram identificados em relatos de casos ou a partir de histórias de pacientes, o que torna as conclusões dessa associação não tão bem estabelecidas.

- Medicamentos

O medicamento mais documentado como causador da anemia aplásica é o cloranfenicol. Embora esse medicamento é mielossupressivo em altas doses devido ao seu efeito no DNA mitocondrial, a ocorrência da anemia aplásica parece ser idiossincrática, talvez relacionada a uma sensibilidade adquirida ao intermediários nitrosos tóxicos [64]. Essa sensibilidade pode produzir a supressão imunológica da medula uma vez que uma grande proporção dos pacientes afetados respondem ao tratamento com terapia imunossupressiva [65]. O risco do desenvolvimento da anemia aplásica em pacientes tratados com clorafenicol é 25 vezes maior do que na população geral [66].

O uso de diversos medicamentos tem sido associado ao aumento do risco para o desenvolvimento de anemia aplásica, mas devido a notificação incompleta dessas ocorrências e a infreqüência dessa associação, o espectro da anemia aplásica induzida por medicamentos não pode ser totalmente

definido. A tabela a seguir apresenta uma lista parcial dos medicamentos que estão implicados na indução da doença [5, 20, 67-73].

Tabela 1. Medicamentos associados à anemia aplásica

Categoria	Alto Risco	Risco Intermediário	Baixo Risco
Analgésico			Fenacetina, aspirina, salicilamida
Antiarrítmico			Quinidina, tocinida
Antiartrítico		Sais de ouro	Colchicina
Anticonvulsivante		Carbazepina, hidantoinas, felbamato	Etossuximida, fenacemida, primidona, trimetadiona, valproato de sódio
Anti-histamínico			Clorfeniramina, pirilamina, tripelenamina
Anti-hipertensivo			Captopril, metildopa
Antiinflamatório		Penicilamina, fenilbutazona, oxifembutazona	Diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, sulindaco
Antimicrobiano			
Antibacteriano		Cloranfenicol	Dapsona, meticilina, penicilina, estreptomicina, antibióticos derivados de β lactama
Antifúngico			Anfotericina, flucitosina
Antiprotozoário		Quinacrina	Cloroquina, mepacrina, pirimetamina
Antineoplásico			
Agente alquilante	Bussulfano, ciclofosfamida, melfalam, mostarda de nitrogênio		
Antimetabólito	Fluorouracil, mercaptopurina, metotrexato		
Antibiótico citotóxico	Daunorrubicina, doxorubicina, mitoxantrona		
Antiplaquetário			Ticlopidina
Antitireoide			Carbimazole, metimazole, metiltiouracila, perclorato de potássio, propiltiouracil, tiocianato de sódio
Sedativo e tranquilizante			Clordiazepóxido, clorpromazina (e outras fenotiazinas), lítio, meprobamato, metiprilon
Derivado de sulfa		Sulfonamidas	Sulfonamidas
Antibacteriano			Clorotiazida, furosemida
Diurético		Acetazolamida	Clorpropamida, tolbutamida
Hipoglicêmico			
Diversos			Alopurinol, interferon, pentoxifilina, penicilamina

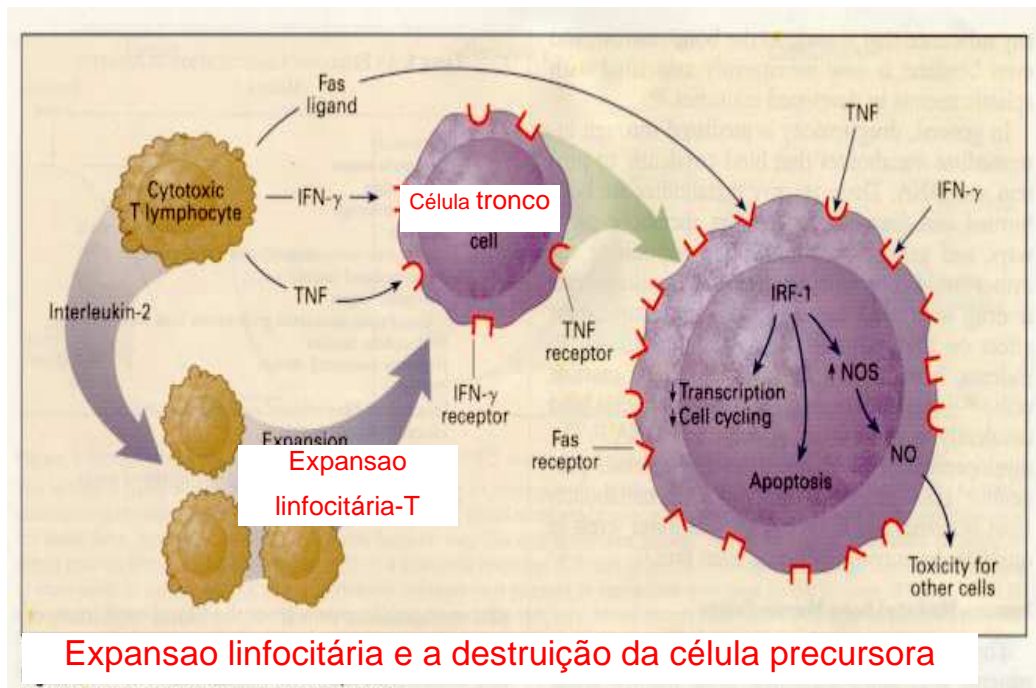
Muitos desses medicamentos também são conhecidos por induzir citopenias seletivas, como a agranulocitose, que usualmente são reversíveis após a descontinuação do seu uso. Essas reações reversíveis não são correlacionadas com o risco de anemia aplásica o que levanta dúvidas quanto a eficácia do monitoramento de rotina utilizando o hemograma como estratégia para evitar anemia aplásica.

Devido ao fato da anemia aplásica decorrente ao uso de medicamentos ser um evento raro, sua ocorrência pode ser devido a uma predisposição metabólica ou imunológica (polimorfismo gênico) em indivíduos suscetíveis. Além disso, parece haver pouca diferença na distribuição por idade, gênero, resposta à imunoterapia, transplante de medula ou sobrevida, quando há ou não exposição prévia ao fármaco precedente ao início da aplasia da medula.

1.2.2 FATORES IMUNOGENÉTICOS

A primeira evidência da autoimunidade na anemia aplásica foi observada em experimentos com cultura de células que mostraram a capacidade dos linfócitos em inibir a formação *in vitro* de colônias hematopoiéticas alogênicas e autólogas. [74, 75]. Estudos realizados posteriormente observaram que linfócitos T citotóxicos mediavam a destruição de células tronco hematopoiéticas na anemia aplásica [76, 77]. Em pacientes com anemia aplásica, células T efectoras são mais notadas na medula óssea do que no sangue periférico e essas células produzem interferon γ e fator de necrose tumoral [78-82]. Há também evidência de uma resposta humoral autoimune na anemia aplásica. Os pacientes que apresentam anemia aplásica tem anticorpos contra cinectina, uma proteína expressa nas células hematopoiéticas e nas células do fígado, ovário, testículos e cérebro[83]. Estudos realizados para avaliação da diversidade e do perfil genético das células T mostraram que há a implicação de uma patofisiologia autoimune na anemia aplásica. As células T de pacientes com anemia aplásica apresentam heterogeneidade limitada do receptor de cadeia β da célula T, o que sugere

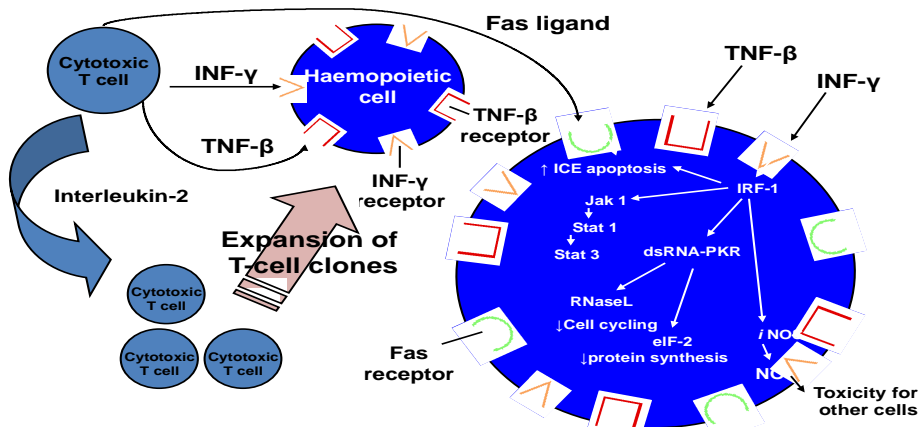
uma expansão oligoclonal da célula T em resposta a um antígeno específico[84, 85].



Figur

a 5. Destruição imune da hematopoese.

Anemia Aplásica Imuno-Mediada



Young N, Maciejewski J. N Engl J Med. 1997;336:1365-72. Young N, et al. Blood 2006;108:2509-19.

Figura

6. Anemia aplásica imuno - mediada

Na anemia aplásica, células CD34-positivas e progenitores hematopoiéticos tem seu número bastante reduzido. Embora as deficiências mielóides (granulocítica, eritroide e megacariocítica) são comuns na anemia aplásica, as deficiências imunológicas são incomuns e a contagem de linfócitos está normal na maioria dos casos, assim com a função das células T e B [86]. As células estaminais hematopoiéticas parecem persistir em muitos pacientes com anemia aplásica, uma vez que a recuperação completa da hematopoiese pode ocorrer com uma terapia imunossupressora eficaz [87]. As células T desses pacientes matam as células estaminais hematopoiéticas de forma HLA-DR restrita e via Fas ligante. [77, 78, 88] Na anemia aplásica, as células tronco hematopoiéticas parecem ser os principais alvos do ataque imune. Quando os pacientes com anemia aplásica são tratados com terapia imunossupressiva, as células estaminais hematopoiéticas primitivas iludem o ataque autoimune permitindo uma recuperação hematopoiética lenta.

HLA e AAA

O HLA (antígeno leucocitário humano) é o sistema genético mais polimórfico. Os genes residem no cromossomo 6 e determinam as moléculas de HLA classe I codificadas pelos loci HLA-A, HLA-B e HLA-C, bem como as moléculas HLA classe II codificadas pelos loci HLA-DR(A,B1,B3,B4,B5), HLA-DQ(A1,B1) e HLA-DP(A1, e B1).[89]

O envolvimento da expansão oligoclonal de células T na fisiopatologia da AAA já está bastante consolidado [89]. A interação de linfócitos CD8 e CD4 com seus alvos são mediadas por peptídeos do HLA Classe I ou II, respectivamente, fica forte a suspeita de que o loci HLA poderia estar implicado na suscetibilidade fisiopatológica da doença. Assim, ao longo dos últimos anos uma serie de estudos envolvendo HLA e AAA, em diversas populações e etnias do mundo foram realizados [89, 90].

Numerosos estudos em asiáticos, caucasianos, árabes, afrodescendentes, mostraram a associação da AAA com o HLA-DRB1*15. Alguns mostraram uma maior associação do alelo HLA-DR*1501 e não do

1502 com a doença. Não existe nenhum estudo que descreva qual a chance de um indivíduo da população normal vir a desenvolver anemia aplásica, como é bem conhecido na espondilite anquilosante (EA) HLAB27 positiva. Interessantemente, nesta doença, apenas de 1% a 3% da população geral com HLA-B27 desenvolvera a EA, o que faz com que não seja indicada esta investigação do HLA em toda a população. Por outro lado 25% dos parentes de primeiro grau de pacientes com EA que tenham HLA-B27 positivo desenvolverão esta doença reumática. Nenhum parente com HLA-B27 negativo desenvolvera a doença. Fica clara a associação da doença com o HLA, porém não sendo ele o único responsável pela sua fisiopatologia [91].

Com relação ao HLA-DR15 e aos prognósticos da doença, estes achados se mostraram conflitantes. Uma pequena maioria de estudos demonstra uma provável melhor resposta clínica aos imunossupressores (baseados em ciclosporina) no grupo de pacientes com este HLA. Entretanto em pacientes com o alelo HLADR1501 talvez o melhor prognóstico já seria mais evidente. Interessantemente, um estudo asiático mostrou respostas impressionantes (ao redor de 80% de resposta) aos imunossupressores (baseados em CSA) num grupo de pacientes com haplótipo DRB1 1501-DQA1 0102-DQB1 0602. Entretanto, este grupo de pacientes com determinado haplótipo se mostrou ciclosporina dependente [92-96]

Estudos tentando entender e demonstrar a importância do HLA em relação a aplasia medular ainda são poucos e os resultados, dado a casuística baixa da doença, mostram dados insipientes. Além do HLADR15, o mais estudado até o momento, alguns outros alelos de HLA se mostraram predisponente no desenvolvimento da AAA, como HLA-DRB1 0405, enquanto outros mostraram que o HLA DRB1 04 teria também uma correspondência a um curso pior da doença e má resposta ao tratamento imunossupressor [89].

Além dos alelos de associação a doença, foi estudada o papel protetor de algumas variantes de HLA. Na Turquia foi demonstrado que o alelo HLA-DRB1 13 teria papel protetor no aparecimento da AAA. Na China, os alelos HLA-DRB1 03:01, HLA-DRB1 11:01, e HLA-B 51:01 se mostraram protetores em crianças com AAA, enquanto na Korea o alelo HLADRB1 1302 foi menos

encontrado significativamente no grupo de pacientes com AAA em relação ao controle [89, 95].

A hipótese de HLAs protetores, de outra maneira, também foi demonstrada. O grupo japonês de AAA, mostrou que uma substancial proporção de pacientes com AAA demonstrou hemopoese clonal caracterizada pela presença de perda adquirida de heterozigocidade (*acquired copy number-neutral loss heterozygosity* -CNN-LOH) no braço curto do cromossomo 6 (6pLOH). Esta perda comumente envolveu o locus HLA levando a perda de um dos haplótipos do HLA. As perdas mais frequentes e que demonstraram significância estatística foram HLA-A*02:01, A*02:06, A*31:01, e B*40:02. Um estudo como este faz sugerir se a hipoexpressão de alelos estaria envolvida com a patogênese da doença, ou se não verdade seria uma hiperexpressão relativa dos alelos remanescentes [97].

Como o HLA está ligado a AAA ainda é uma questão intrigante. Alguns mecanismos são propostos e interrogados:

- 1- Células T citotóxicas seriam capazes de receber apresentação antigênica (de células tronco hematopoéticas) somente através de alguns alelos de HLA s [89, 98]
- 2- Baseado em estudos com doenças onde o HLA está intimamente ligado a fisiopatologia da doença como na EA e o HLAB27, foi demonstrado que uma das causas da doença poderia estar associada a peptídeos derivados do HLAB27. Estudos conseguiram demonstrar que peptídeos sintetizados derivados do HLAB27 (porção do HLA-B27) injetados em pacientes e controles poderiam ser reconhecidos como auto-antígeno, gerando a proliferação de células T gama-delta autorreativa [99].
- 3- Recentemente Dr. Chen levantou uma interessante teoria sobre a associação do HLA e doenças autoimunes. Ele demonstra que na verdade alguns antígenos HLA estariam associados a genes, que estes sim estariam mais envolvidos com a doença. Como se na verdade, o HLA fosse um marcador indireto do real fator predisponente. Usando a EA, ele demonstrou que existe uma associação do HLAB27 com um gene e seu produto ERAP1 (*endoplasmic reticulum associated aminopeptidase 1*). A ERAP1 tem potencial em aparar os peptídeos ao

tamanho e comprimento ótimo para se ligar ao HLAB27 no retículo endoplasmático. Isso sugere a hipótese de que alguma coisa ligada ao processo de “apara” do transporte, processamento e apresentação do peptídeo antigênico no paciente HLAB27 teria implicância fisiopatológica. Ao final, haveria alguma anormalidade na apresentação do peptídeo pelo MHC classe I ao receptor de células T-CD8 [100].

- 4- Alguns autores sugerem outras associações indiretas do HLA com doenças autoimunes, mas também associações diretas. Como se o indivíduo que tem determinada doença associada ao HLA, também teria outros achados concomitantes. Fiorillo et al, descreve achados muito interessantes de pacientes com EA-HLA B27 e ausência de auto-receptores em populações de células T CD8. Em seu estudo conseguiu demonstrar que estes determinados receptores de célula (TCR) de linfócitos CD8 seriam específicos para o receptor VPAC1- *self-epitope (pVIPR) derived from the vasoactive intestinal peptide Type 1 (VPAC1)*, que por sua vez seriam extremamente semelhantes a epítopes virais, como vírus EBV. Foi sugerida uma possível implicação de reatividade cruzada mediada por células-T na patogênese da doença [97].
- 5- Alguns autores vêm buscando a explicação de doenças auto-imunes e infecções, como as virais. A associação de alguns peptídeos virais extremamente semelhantes a auto-peptídeos seriam dependentes exclusivos do MHC classe HLAB-B7, o que explicaria o fator viral como gatilho e a dependência do HLAB27 [101].

Polimorfismo gênico de citocinas e AAA

O polimorfismo gênico vem sendo cada vez mais conhecido, e com isso sua influência na determinação do câncer e de doenças autoimunes. Os polimorfismos de nucleotídeos (SNPs) em diversos genes já tem comprovada associação com doenças como artrite reumatoide, doença de grave e esclerose múltipla. A busca com essa associação e a AAA vem sendo estudada nos últimos anos. Entretanto pela raridade da doença a sua compreensão fisiopatológica é muito difícil. Alguns polimorfismos já tiveram sua

associação com AAA demonstrada [1]. Dentre os diversos polimorfismos imunogenéticos estudados os mais relevantes e associados com a AAA formam o TGF-beta codons 10/25, IFN- γ , IL-4 codons 590/1089 e o IL4-Ra 1902. Entretanto eles não se mostraram ainda como fator prognóstico preditor de resposta ao tratamento imunossupressor. Este conhecimento serviu por enquanto para compreensão da fisiopatologia da doença, e não para as decisões terapêuticas [89].

A pesquisa de polimorfismos de moléculas como Fas, interleucinas como IL-1beta, IL-6, IL-10 e IL-12, que sabidamente tem papel descrito na patogênese da doença, foi realizada por diversos e diferentes grupos sem, entretanto, se encontrar diferença significativa entre os pacientes com AAA e os grupos controles [89].

Dentre as citocinas envolvidas na fisiopatologia da AAA, o IFN- γ é a mais estudada e reportada. O seu polimorfismo passou recentemente a ser pesquisado e os achados corroboraram o que se suspeitava. O INF- γ , da classe de citocinas do INF tipo II, é considerado uma citocina efetora da resposta imune inata e adaptativa secretado por células NK, LTh1 CD4+ e LT CD8+ e possui receptores celulares do tipo II [102]. O gene do INF- γ está localizado no cromossomo 12 (12q24.1), consistindo em quatro éxons e três íntrons, que codificam um polipeptídeo de 166 aa e outro que serve como sinal de 20 aa [103].

O IFN- γ exerce papel crítico na imunidade inata e adaptativa contra infecções intracelulares virais e bacterianas e no controle da transformação tumoral. Entre as ações biológicas está a ativação de macrófagos, estimulando a ação dos LTc e NK na eliminação dos microorganismos fagocitados. Dentre algumas de suas funções, destaca-se a de (i) estimular a expressão de moléculas MHC-I e II e co-estimuladores nas células apresentadoras de antígenos (APC), (ii) a síntese de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, (iii) a diferenciação de LT CD4+ para Th1 e inibição do Th2, (iv) a ativação do complemento, de neutrófilos e de células NK permitindo a fagocitose de microorganismo [104]

De acordo com Schoenborn et al, a região de ligação do NF- κ B encontra-se no primeiro íntron (íntron 1), que em última instância, seria o

responsável pelo controle da produção de IFN- γ . Entre os vários polimorfismos descritos no gene do IFN- γ , destaca-se o da região +874 do íntron 1, coincidindo com a área de ligação do NF- κ B. O alelo selvagem desta região é a timina (T), que pode sofrer mutação para adenina (A) podendo resultar em menores níveis séricos do IFN- γ . O indivíduo com genótipo AA, conseqüentemente teria menor produção e secreção desta citocina, e segundo alguns estudos, os tornaria mais suscetíveis a determinadas infecções como a tuberculose. O indivíduo com genótipo TT seria maior produtor e secretor de IFN- γ , e conseqüentemente mais suscetível a doenças auto-imunes, hiperresponsividade a infecções, processos alérgicos, etc. [105].

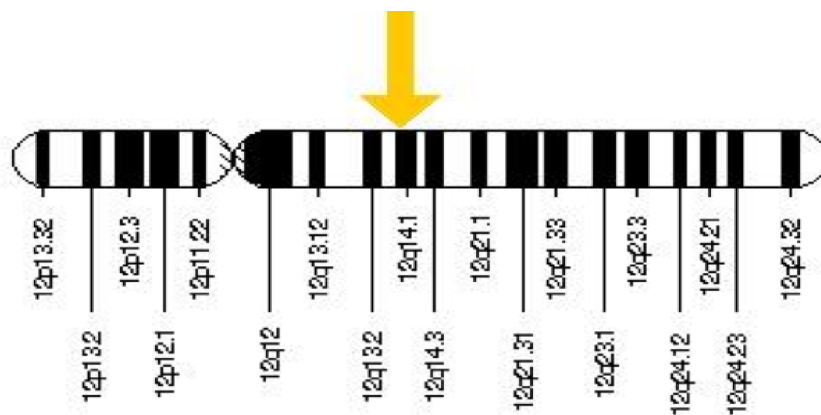


Figura 7. Localização do gene do IFN-gamma.(Cromossomo 12)

Além disso, o polimorfismo do TNF também demonstrou relação na fisiopatologia da doença. O gene promotor de polimorfismo TNF-308, especificamente o seu alelo TNF2 (-308A), tem sido associado a níveis elevados de TNF. Sabe-se que níveis elevados de TNF contribuem para a susceptibilidade à AAA de uma forma DR3 e DR4 independente. No entanto, nenhuma susceptibilidade foi demonstrada em formas mais suaves de AA, o que é consistente com outras observações em que a distribuição do alelo TNF2 não diferiu entre os pacientes portadores de AA em relação ao controle. Apesar disso, há observações contraditórias onde o genótipo específico AA -308 TNF foi apresentado no grupo de pacientes com AA. De acordo com um estudo alemão, tal associação não foi demonstrada. As respostas à terapia imunossupressora foram melhores devido a esse alelo raro, mesmo após três meses de tratamento em comparação com não portadores. Os diferentes

resultados observados nesses estudos podem ser atribuídos ao baixo número de indivíduos avaliados e a heterogeneidade dos pacientes em relação a grau da doença e etnia [89].

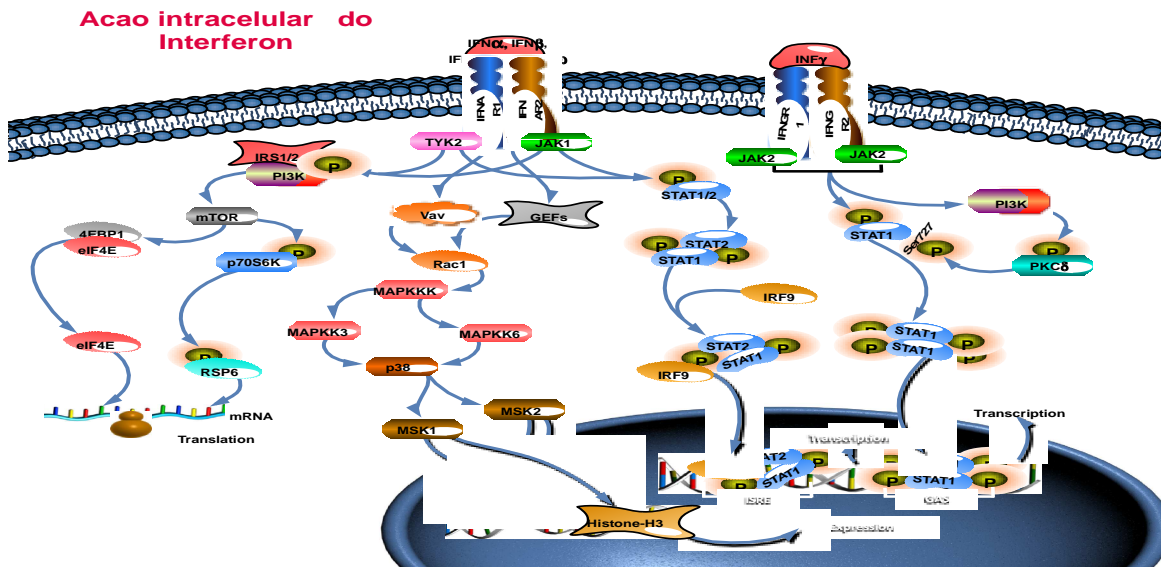


Figura 8. Ação intracelular do interferon.

2.2.3. Outras Moléculas da Imunidade

O aumento da expressão de IFN- γ , TNF, e IL-2 em pacientes AA indica que as células estaminais hematopoiéticas e progenitoras são destruídas através de uma resposta celular T-helper (Th)1. T-bet ou TBX21 pertencentes à família de fatores de transcrição T-box e é o regulador chave do desenvolvimento e da função de células Th1, sendo encontrada somente em células Th1, mas não em células Th2. Em pacientes com AA, T-bet está elevado e transcreve ativamente o gene IFN- γ .

O gene TBX21 tem sido sugerido como um gene de risco comum para uma grande variedade de doenças auto-imunes. Curiosamente, o alelo C de t-1993c, o promotor do gene TBX21, foi associado a uma diminuição do risco em AA. O transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (STAT4) é um fator de transcrição ligante para genes que codificam T-bet e IFN- γ e desempenha um

papel fundamental na diferenciação de células Th1 e Th17. Os polimorfismos do gene STAT4 têm sido associados a várias doenças autoimunes; entre os polimorfismos testados, o rs7574865 era um candidato comum de risco de polimorfismo. Em uma coorte de população chinesa, o polimorfismo rs7574865 foi encontrado para representar como um gene candidato de suscetibilidade, com um aumento da frequência do alelo T e o genótipo TT. No entanto, não houve associação entre o polimorfismo acima mencionado e a resposta ao IST foi estabelecida.

As moléculas que são expressas em células T que afetam a auto-tolerância e a autorreatividade têm sido extensivamente estudadas em doenças autoimunes. O antígeno do linfócito T citotóxico 4 (CTLA4) é uma molécula expressa nas células T ativadas que regulam a autorreatividade das células T. Os polimorfismos que resultam em expressão reduzida de CTLA4 têm sido associados à outras doenças autoimunes. No entanto, essas associações não foram observadas em pacientes com AA em uma coorte de uma população italiana. A SNP de morte celular programada -1 (PDCD-1) foi estudada em um grande número de pacientes chineses com AAA. O alelo PD-1.1 foi associado a um maior risco do desenvolvimento da doença.[1]

1.2.3 FATORES MICROAMBIENTAIS

Embora o encurtamento dos telômeros esteja presente em 40% dos pacientes com anemia aplásica, o seu papel no desenvolvimento da doença permanece obscuro. As deficiências no reparo do telômero podem predispor à anemia aplásica afetando o tamanho da divisão da célula hematopoiética pluripotente e diminuindo a resposta da célula pluripotente ao dano medular. Além disso, tais deficiências podem desempenhar um papel na evolução da anemia aplásica para uma doença clonal mieloide contribuindo para a instabilidade do genoma [30]. O encurtamento dos telômeros seria uma das explicações para a exaustão medular, ou dificuldade de re-expansão das células progenitoras após o dano imunológico. Em geral, um terço dos pacientes não responde ao tratamento imunossupressor. Tal explicação se

daria ou por mecanismo etiológico não imuno mediado ou por falência completa do repertório das células tronco primordiais.

1.2.4 AAA E OUTRAS ASSOCIAÇÕES

A etiologia da AAA pode estar associada a manifestações de doenças clonais tais como a hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), infecções virais e em casos raros de gravidez.

1.2.4.1 HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma doença adquirida das células precursoras hematopoiéticas e pode ocorrer em associação ou de forma secundária a uma alteração medular em casos de AA ou outras síndromes mielodisplásicas. A hemólise intravascular, trombofilia e falência medular são as manifestações clínicas mais frequentes da HPN. Entretanto, as manifestações bem como a gravidade dos sintomas podem se apresentar de forma bastante variável. [106]

A fisiopatologia da HPN ocorre a nível medular, nas células precursoras da medula óssea, ocasionando produção de células com deformidades em níveis e linhagens celulares seguintes. As células são produzidas com deficiência na síntese da molécula glicosilfosfatidilinositol (GPI) e consequente redução de expressão das proteínas de membrana ancoradas a esta molécula e ocorrem devido à falta de enzima α -1,6N-acetil-glicosaminil. Foi descrito anteriormente que o gene associado à GPI, é o fosfatidil-inositol-glicano de classe A (PIG-A) localizado no braço curto do cromossomo X [106].

A presença isolada do clone HPN (célula com mutação PIG-A) não indica a manifestação clínica da doença. Para que a HPN se apresente clinicamente, é necessário que a presença do clone HPN se expanda na medula óssea e domine a hematopoese [106]. O clone HPN pode ser encontrado em indivíduos saudáveis sem manifestações da doença através de técnicas com capacidade de detecção de uma célula clonal para 1.000.000 de

células normais (0,002% em média) [107].

Ainda não foram estabelecidas a causa para a vantagem seletiva das células PIG-A mutadas em relação as células normais. Dentre as hipóteses incluem a possibilidade do clone HPN possuir maior resistência a ataques citotóxicos pelos linfócitos T e pelas células NK além de uma vantagem proliferativa em relação às células normais. Entretanto, é provável que outros genes estejam envolvidos [108-110]

A relação fisiopatogenética entre a AAA e a HPN ainda é desconhecida. Entretanto, sabe-se que os pacientes com HPN tem um risco de 10 a 20% de desenvolver anemia aplásica devido à hipoplasia da medula óssea com uma hematopoiese deficiente. Já os pacientes com anemia aplásica poderão desenvolver HPN em 5% dos casos de AAA.

1.2.4.2 GRAVIDEZ

Casos raros de AAA foram relatados em pacientes grávidas. Devido à raridade dos relatos não foi estabelecida a relação e a causa da ocorrência. Em alguns casos de AAA durante o início da gravidez, foram recomendados que a gravidez fosse interrompida com indicação de transplante de medula óssea, caso necessário. Nos demais casos, é recomendado que seja realizado tratamento de suporte da mãe até o nascimento do recém-nascido. Entretanto, devido à raridade do caso, não existe recomendação do melhor manejo clínico da condição.

1.2.4.3 AAA ASSOCIADA À HEPATITE

Foram reportadas cerca de 2% a 10% de casos de anemia aplásica relacionada à hepatite em diferentes regiões de acordo com a prevalência de infecções de hepatite e vírus da síndrome de imunodeficiência. Tal síndrome é reconhecida como uma variante distinta da anemia aplásica que ocorre após uma crise aguda de hepatite ocasionando em falência da medula óssea e pancitopenia grave.

Geralmente não se identifica o vírus deflagrador, entretanto diversos vírus e agentes já foram reportados nesta síndrome como vírus da hepatite A,B,C,D,E,G parvovírus B19,CMV, EBV, TTV e vírus da hepatite não A->E. O vírus ou o agente causador pode ser um gatilho para a resposta imune para a aplasia medular.

Altas taxas de respostas são obtidas com o tratamento clássico instituído as AAA idiopáticas, baseado em imunossupressão ou transplante de medula óssea. A AAA associada à hepatite é mais frequente em indivíduos jovens, dessa forma o transplante de medula óssea é a terapia mais indicada e empregada. Apesar dos mecanismos ainda pouco elucidados, a síndrome já é bastante reconhecida como uma entidade específica de aplasia (AAAH - anemia aplasia associada à hepatite) [35].

1.3 DIAGNÓSTICO DA AAA

O diagnóstico da AAA consiste em hipocelularidade da medula óssea e pode ser classificada, de acordo com a gravidade e a hipocelularidade, como anemia aplásica, anemia aplásica grave e anemia aplásica muito grave [29].

Tabela 2. Classificação de gravidade da AAA (29)

Gravidade	Critérios
Anemia aplásica	Medula óssea com celularidade < 25%, ou 25% a 50% com < 30% de células hematopoiéticas residuais
Anemia aplásica grave	<p>Critério de anemia aplásica associado a pelo menos dois dos três itens abaixo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Valores de neutrófilos abaixo de 500/mm em sangue periférico. • Valores de plaquetas abaixo de 20.000/mm² em sangue periférico. • Valores de reticulócitos abaixo de 20.000/mm²
Anemia aplásica	Critério de anemia aplásica grave associada a neutrófilo

Determinadas patologias podem apresentar um quadro de pancitopenia sem aplasia medular, e em outros casos pode ocorrer hipoplasia medular, geralmente transitória e secundária a outro fator agudo. Dessa forma, é importante realizar o diagnóstico confirmatório da avaliação da medula óssea através de biópsia, assim como excluir de forma definitiva os diagnósticos diferenciais destacando-se a anemias aplásicas hereditárias (anemia de Fanconi, disqueratose congênita, síndrome de Shwachmann-Diamond e anemia de Blackfan Diamond), síndromes mielodisplásicas hipoplásicas, hemoglobinúria paroxística noturna, infiltração neoplásica, osteopetrose, hiperesplenismo, deficiência de vitamina B12, deficiência de ácido fólico, deficiência de piridoxina, doenças de depósito, lupus eritematoso sistêmico, septicemia, doenças infecciosas como calazar, tuberculose miliar, doenças fúngicas disseminadas, septicemia, malária e AIDS [29].

1.4 TRATAMENTO DA AAA

O advento de novos imunossupressores para os pacientes não elegíveis ao TMO e a introdução da TMO mais imunoablativo que mieloablativo mudaram o manejo e as diretrizes de tratamento de pacientes com AAA.

A conduta de manejo da AAA deve ser realizada de acordo com a severidade da citopenia. Entretanto, na maioria dos casos, a AAA deve ser tratada como uma urgência hematológica devido ao elevado risco de morte se o tratamento não for realizado de forma imediata.

O tratamento principal e definitivo da AAA tem como objetivo o controle da pancitopenia através da restauração da hematopoiese por meio do TMO alogênica e através da terapia imunossupressora. Além disso, os pacientes também devem receber suporte clínico e hemoterápico, assim como o manejo do controle dos sintomas relacionados à anemia e plaquetopenia como hipoxia tecidual e hemorragias. Os pacientes possuem alto risco de desenvolver infecções em casos de neutropenia grave [29].

Durante a década de 50, os pacientes com AAA sem o condicionamento com quimioterapia não apresentavam sucesso ao enxerto pós transplante TMO. O sucesso do enxerto ocorreu apenas após o uso de imunossuppressores prévio ao procedimento de TMO. Atualmente, o TMO é o tratamento de escolha para os pacientes com AAA severa (com valores de neutrófilos inferior a $500/\text{mm}^2$) e pacientes com idade inferior a 40 anos que possuam doador com HLA compatível. Pacientes não elegíveis para realizar TMO devem receber tratamento com um imunossupressor. A associação da ciclosporina e a timoglobulina é considerado como tratamento padrão para estes pacientes. [24, 29, 111-119]

O medicamento mais utilizado em monoterapia e em primeira linha é a ciclosporina com taxas de respostas superiores a 50% e sobrevida global em 5 anos acima de 50%. Além disso, existem outros fatores que contribuem para o uso da ciclosporina e incluem alta disponibilidade, bom acesso a medicação, posologia favorável com fácil uso em relação à timoglobulina. Além dos preços elevados, a timoglobulina deve ser administrada em leito e em longos períodos. [120-122].

A padronização da retirada lenta e gradual dos imunossuppressores se fez após aprendizado ao longo dos últimos anos, além de que muitos pacientes serão pacientes ciclosporina dependentes [29, 123]. Apesar das altas taxas de resposta, o tratamento com imunossuppressores possui uma taxa de recaída em 20% dos casos. A reintrodução do tratamento imunossupressor é capaz de reverter a recaída. Entretanto, o uso de imunossuppressores em segunda linha de tratamento em pacientes que interromperam o tratamento pode induzir uma resposta hematológica em aproximadamente 50% dos casos.

Existem poucos estudos clínicos randomizados e prospectivos avaliando os tratamentos e desfechos de pacientes com AAA devido à raridade e a baixa frequência da doença.

1.5 FATORES PROGNÓSTICOS

Alguns estudos avaliaram os fatores prognósticos de resposta ao

tratamento imunossupressor. Foram identificados alguns fatores de boa resposta por alguns autores, como presença de HLA – DR15 [92, 93, 124-129], reticulócitos >20.000 aos 2 meses do início do tratamento imunossupressor, tempo entre diagnóstico e tratamento, idade, maiores valores leucocitários, maior celularidade medular, entre outros [130-132].

Fatores prognósticos negativos reportados incluem alterações citogenéticas, como alteração do cromossomo 7, celularidade medular <5%, maior necessidade transfusional plaquetária previamente ao início do tratamento, etc [130-132].

2 JUSTIFICATIVA E INOVACAO

No Brasil, os pacientes com AAA ainda não foram devidamente avaliados. Conseqüentemente, dados brasileiros relacionados ao perfil epidemiológico e desfechos da doença de pacientes são escassos ou inexistentes para algumas regiões do país. Além disso, são necessários dados adicionais avaliando a relação de desfechos, as diferentes etnias e fatores ambientais com a AAA no país. Visando preencher essas lacunas e considerando-se a grande variabilidade étnica no Brasil, o presente estudo teve como objetivo primário descrever o perfil epidemiológico, clínico e laboratorial da AAA no estado da Bahia através da avaliação da descrição das variáveis relacionadas já conhecidas. Entretanto, pouco se conhece sobre a fisiopatologia da doença. Sabe-se da grande associação da doença com o sistema humano de HLA e com o polimorfismo de citocinas. Ademais, não foi relatado nenhum estudo que faça esta associação independentemente e não há registro de publicação em literatura mundial como variáveis dependentes. Os dados do estudo podem fortemente contribuir para o conhecimento da fisiopatologia desta doença e de doenças autoimunes de mecanismos semelhantes.

Em segunda análise, de acordo com estudos reportados, e frequentemente controversos, tentar-se-á analisar fatores prognósticos ao tratamento imunossupressor nos pacientes com AAA no Estado da Bahia. A hipótese é que muitos fatores étnicos, regionais e ambientais tenham claramente influência no prognóstico e nos desfechos da doença. Tais resultados podem colaborar para o desenvolvimento de novas estratégias e diretrizes de manejo desses pacientes.

Atualmente, a associação de timoglobulina com ciclosporina é a terapia imunossupressora aceita como padrão ouro. Entretanto, não ha' registros de estudos mostrando que o uso com ciclosporina é inferior à terapia combinada. Sendo assim, antes de se propor estudos clínicos de fase 3, é necessária a demonstração da eficácia de estudos de fase 2 com monoterapia com ciclosporina. A terapia combinada possui alto custo e não está disponível na

rede pública brasileira. Além disso, para administração da associação é necessário leitos em hospital de alta complexidade. A ciclosporina em monoterapia, além de estar disponível no SUS, possui baixo custo, com fácil administração e de uso ambulatorial, sem necessidade de leitos para sua administração. Assim, é muito importante que se demonstre se a terapia atualmente instituída na rede pública está adequada ao tratamento desta rara e grave doença. Em caso de eficácia comprovada, o Brasil e outros os países que carecem de leitos, sobretudo de alta complexidade, poderiam se beneficiar com este tratamento.

Dessa forma, o estudo foi conduzido considerando-se os questionamentos abaixo:

- I. Os fatores epidemiológicos, clínicos e laboratoriais no Brasil, e no estado da Bahia, são os mesmos descritos pela literatura mundial? Existem associações entre eles e a doença?**
- II. Temos fatores preditores de resposta ao tratamento com imunossupressor em pacientes com AAA no Estado da Bahia?**

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo primário do estudo foi caracterizar epidemiológica, clínica e laboratorialmente os pacientes com anemia aplásica atendidos de 2005 a 2013, no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia, provenientes da rede de saúde e da Fundação Hemoba, através das variáveis ao diagnóstico.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Os objetivos secundários do estudo foram:

- 1- Descrever as taxas de resposta ao tratamento imunossupressor baseado em ciclosporina aos 4 meses de tratamento (óbito, vivo sem resposta, vivo com resposta parcial e vivo com resposta completa);

- 2-Descrever as taxas de sobrevida global em cinco anos dos pacientes que foram tratados inicialmente com terapia imunossupressora baseado em ciclosporina
- 3-Verificar a influência dos fatores epidemiológicos clínicos e laboratoriais (variáveis) nas taxas de resposta aos 4 meses tratamento imunossupressor e nas taxas de sobrevida global aos 5 anos;
- 4-Verificar a associação de variáveis ao diagnóstico (contagem linfocitária global, presença de HLA DR15, severidade da doença) com as taxas de resposta aos 4 meses e com as taxas de sobrevida global aos 5 anos;
- 5-Verificar a associação HLA-DR15 com as variáveis idade, severidade da doença e polimorfismo de citocinas.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Um estudo retrospectivo foi conduzido para avaliar as características clínicas laboratoriais de pacientes com anemia aplásica. O estudo foi conduzido no HUPES/UFBA com pacientes provenientes da rede de saúde e da Fundação Hemoba.

Foram incluídos todos os pacientes que tiveram este diagnóstico confirmado e que foram atendidos no Hupes e na Fundação Hemoba, no período de jan/2005 a junho/2013.

O estudo de registro retrospectivo foi avaliado e aprovado para condução pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da instituição, com a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo, embora assegurado que o caráter anônimo dos pacientes será mantido e que suas identidades serão protegidas. O estudo foi registrado no CEP do

Hupes/UFBA como numero 67/2011. Entretanto, todos os pacientes submetidos a tratamento assinam termo de consentimento antes do inicio do tratamento .

4.2 CASUÍSTICA

Foram incluídos no estudo todos os pacientes com o diagnóstico de anemia aplásica sem restrições de idade e atendidos consecutivamente no Hupes e na Fundação Hemoba. Estes dois centros recebem a quase totalidade de casos da rede SUS com este diagnóstico no estado, sobretudo pela regulamentação da dispensação de medicamentos para esta doença ser bastante restrita. Eventualmente pacientes da rede privada são atendidos fora destes centros. Não houve cálculo de amostragem. Todos os pacientes foram incluídos sequencialmente durante o período mencionado.

Devido à gravidade e raridade da anemia aplásica, todos os pacientes da rede pública e a maioria da rede privada são atendidos nos centros de referência deste estudo. Entretanto, esta amostra não representa a totalidade dos casos, pois os pacientes com esta doença podem não chegar a ter seu diagnóstico firmado devido a dificuldade de realização do mesmo em algumas áreas do estado. Assim, tipo de amostra: amostra de conveniência(todos os que chegaram ao centro de diagnostico e tratamento).

4.3. METODOLOGIA

4.3.1: Critérios de Inclusão:

Todos os pacientes incluídos no estudo possuíam o diagnóstico de aplasia com confirmação através de biópsia da medula óssea. Depois de realizado o diagnóstico, o paciente prosseguiu o protocolo clinico já em curso pelo centro (Apêndice II). De acordo com o protocolo da instituição, os pacientes poderiam receber o tratamento imunossupressor ou o tratamento com TMO alogênico. Os pacientes que foram encaminhados para TMO só tiveram os dados relacionados ao diagnóstico analisados.

4.3.2. Critérios de exclusão:

- Pacientes que não tiveram seu diagnóstico confirmado por Biópsia de MO;
- Pacientes com causas de aplasia congênitas como anemia de Fanconi .

4.4.1 Variáveis do estudo (ao diagnóstico)- variáveis clinico-epidemiológicas

Os dados foram coletados e avaliados através de revisão dos prontuários dos pacientes da instituição. As informações demográficas e clínicas coletadas dos pacientes elegíveis foram:

1. Idade ao diagnóstico
2. Etnia/raça
3. Cidade/região de proveniência
4. Cidade/região de naturalidade
5. Exposição ocupacional a agentes tóxicos, exposição a fármacos/infecções. Foram considerados como agentes tóxicos/fármacos os citados pela literatura (Marsh J.). Na anamnese do paciente com anemia aplásica é considerada como de risco aquela exposição com no máximo 6 meses antes do aparecimento da aplasia e no mínimo 1 mês.
6. Hemograma ao diagnóstico com contagens dos valores:
 - a. Hemoglobina;
 - b. Volume corpuscular médio (VCM);
 - c. Neutrófilos absolutos;
 - d. Linfócitos absolutos;
 - e. Plaquetas
7. Tipização HLA: A tipagem molecular dos alelos HLA-A*, -B* e -DRB1* foi realizada utilizando-se a metodologia LABType® SSO classe I A* e B* e classe II DRB1* (One Lambda,CA,USA). Esta metodologia aplica a tecnologia Luminex® ao método de tipagem de ADN SSO invertido. Primeiro, o ADN alvo é amplificado na PCR utilizando um primer específico para o grupo. O produto de PCR é biotilado, o que lhe permite ser detectado utilizando estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (SAPE). O produto de PCR é desnaturado e são re-hibridados nas sondas complementares de ADN conjugadas com as

microesferas codificadas por fluorescência. Um analisador de fluxo, o LABScan™ 100, identifica a intensidade fluorescente da PE (ficoeritrina) em cada microesfera. A atribuição da tipagem HLA baseia-se no padrão de reação comparado com os padrões associados às sequências de genes HLA publicadas.

4.5 Tratamento instituído

Os tratamentos instituídos foram o TMO alogênico ou terapia Imunossupressora:

4.5.1-Transplante de Medula óssea alogênico.

Foram identificados os pacientes que foram submetidos ao TMO

4.5.2-Terapia Imunossupressora:

a) CSA associada ou não a prednisona. O tratamento imunossupressor do protocolo da instituição consistiu na ciclosporina 5-7 mg/kg/dia (divididos em 2 tomadas). O ajuste de dose da CSA foi realizado de acordo com a tolerabilidade clínica, efeitos colaterais, disfunção renal e hepática e valores de concentração de nível sérico (200 - 400 ng/dl). Quando apresentando resposta o uso mínimo foi de um ano, com reduções de dose lenta e progressiva após atingir a resposta máxima sustentada por pelo menos 3 meses (Apêndice III).

4.5.3 Variáveis do estudo após instituído o tratamento

1-Resposta Clínica aos 4 meses:

Os pacientes tratados com imunossupressão foram avaliados com relação à resposta clínica aos 4,5 meses (+ ou - 30 dias) em vivo com resposta completa, vivo com resposta parcial, vivo sem respostas, e óbito. (Tabela 3, critérios de resposta ao TI).

Tabela 3. Critérios de Resposta ao Tratamento Imunossupressor

Tipo de resposta	Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (/uL)	Plaquetas (/uL)	Necessidade transfusional
Completa	>0,5x10 ⁹	> 1000	> 100.000	-
Parcial	>8	> 500	> 30.000	Necessidade transfusional
Sem resposta	-	-	-	Necessidade transfusional

2-Sobrevida Global ao tratamento:

Foram coletados os dados e datas dos pacientes, ao longo de todo do acompanhamento clínico até a última consulta registrada. Para esta variável foram considerados os pacientes apenas como vivos ou não vivos.

3-Resposta clínica global até o último acompanhamento

Foram coletados os dados e suas datas da última avaliação do paciente: vivo sem resposta em tratamento; vivo com resposta parcial em tratamento; vivo com resposta sem tratamento; óbito.

4-Resposta clinica ao tratamento imunossupressor até o último acompanhamento:

vivo sem resposta ao tratamento, em uso de outro tratamento; vivo sem resposta em uso de tratamento imunossupressor a base de inibidor de calcineurina (csa ou tacrolimus) e em uso deste tratamento; vivo sem resposta ao tratamento imunossupressor a base de inibidor de calcineurina e sem uso deste tratamento; vivo com resposta parcial em uso de tratamento imunossupressor a base de inibidor de calcineurina; vivo com resposta parcial em uso de tratamento imunossupressor a base de inibidor de calcineurina e no momento sem o uso deste tratamento; óbito.

5-Data do término do tratamento imunossupressor a base de ciclosporina foram coletadas as datas em que o paciente teve seu tratamento imunossupressor à base de inibidor de calcineurina interrompido.

Limitações do estudo:

O desenho estudo implica em uma avaliação retrospectiva, dessa forma alguns dados não foram resgatados nos prontuários. Os dados que não foram coletados foram deixados em branco na ficha clínica do estudo.

4.6 Delineamento Experimental do paciente em acompanhamento

Pacientes com pancitopenia encaminhados para os centros de referência

(n: 250)



Pacientes com provável diagnóstico de AAA (n:230)



Afastado causas de anemia aplásica congênitas (Fanconi)



Pacientes com diagnóstico de AAA (n:215)



Tratamento Instituído (n:106)



(TI) Trat. imunossupressor (n:69)

TMO (n:24)

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram bicaudados e foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados com auxílio do software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 20.0, Chicago, IL, EUA).

1-Dados epidemiológicos

Para a análise descritiva, as variáveis categóricas foram expressas através de suas proporções. As médias e desvios-padrão foram calculados para as variáveis contínuas com distribuição normal e medianas e quartis para as não-normais.

2-Distribuição geo-espacial dos casos de Anemia Aplásica no estado da Bahia:

Para a busca de um padrão de distribuição ou aleatoriedade dos casos de anemia aplásica no estado da Bahia foram utilizadas duas técnicas de geoestatística espacial: o semivariograma e envelope simulado com o teste de aleatorização utilizando matriz de Mantel.

Semivariograma e envelope simulado:

O método estatístico mais utilizado em Geoestatística para verificar a existência de dependência espacial é o semivariograma. A construção do semivariograma para identificar a dependência espacial origina-se das diferenças entre dois pontos georreferenciados no espaço e separados por uma distância h (Ortiz, 2002, Oliveira, 2003 e Pilon, 2004). Embora o semivariograma seja muito utilizado na Geoestatística para avaliar a dependência espacial, este método não é muito aconselhável em algumas situações. Após fazer o semivariograma, deve-se fazer o gráfico do envelope simulado. O gráfico do envelope simulado, obtido através do semivariograma, é

utilizado para verificar a existência de padrão espacial nos dados. Os limites do envelope são obtidos aleatorizando-se a ordem da posição das observações e considerando-se a variável resposta fixa. Com base em um grande número de aleatorizações calculam-se esses limites e, se existir algum ponto fora desses, é uma evidência da existência de padrão espacial.

Teste de aleatorização utilizando matriz de Mantel:

Uma alternativa ao semivariograma para verificação de existência de padrão espacial é utilizar uma adaptação do teste de aleatorização de Mantel (1967). Esse teste permite estudar, a partir da configuração dos pontos observados, a existência de padrão espacial e tem como base a comparação de duas matrizes de distâncias, verificando se existe correlação entre os elementos destas matrizes (Viola, 2007). Um teste de aleatorização fornece evidência de que certo padrão nos dados pode, ou não, ter aparecido por acaso, ou seja, sob a hipótese nula, todas as possíveis ordens para os dados têm a mesma chance de ocorrer (Manly, 2006). Considere um conjunto de dados com a localização das respostas observadas, em que o interesse do pesquisador é testar a hipótese nula da ocorrência de padrão espacial aleatório versus a hipótese alternativa de padrão espacial não aleatório. Dentre as vantagens em se utilizar o teste de aleatorização, destaca-se o uso em amostras não aleatórias e/ou amostras pequenas, porém seu resultado não pode ser generalizado para a população. O teste de aleatorização é baseado no fato que, se a hipótese nula é verdadeira, todas as possíveis ordens para os dados têm a mesma chance de ocorrer. Para aplicar este teste, calcula-se o valor e_o de uma estatística E . A seguir, faz-se um grande número de aleatorizações obtidas por reordenações aleatórias dos dados. As aleatorizações realizadas fornecem os valores e_a que irão gerar uma aproximação por simulação da distribuição amostral de E . A decisão do teste é guiada pelo p -valor que é a proporção dos valores e_a que são maiores do que ou iguais a e_o . Por exemplo, se $p\text{-valor} < 0,05$, conclui-se que existe evidência de que a hipótese nula não seja verdadeira ao nível de 5% de significância (Manly, 2006 e Viola, 2007). Para fazer o teste de aleatorização utilizando uma adaptação do teste de aleatorização proposto por Mantel (1967), considere duas matrizes, A e B ,

simétricas, com dimensão $n \times n$, cujos elementos representam as distâncias da localização das observações e das respostas, respectivamente, logo:

$$A = \begin{pmatrix} 0 & a_{21} & \dots & a_{n1} \\ a_{21} & 0 & \dots & a_{n2} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_{n1} & a_{n2} & \dots & 0 \end{pmatrix} \text{ e } B = \begin{pmatrix} 0 & b_{21} & \dots & b_{n1} \\ b_{21} & 0 & \dots & b_{n2} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ b_{n1} & b_{n2} & \dots & 0 \end{pmatrix},$$

em que $a_{ij} = \sqrt{(x_{1i} - x_{1j})^2 + (x_{2i} - x_{2j})^2}$, $b_{ij} = \sqrt{(z_i - z_j)^2}$, $\mathbf{X}=(x_1, x_2)$ são as coordenadas cartesianas e Z é o vetor de respostas. A estatística teste (e_o) é dada pelo coeficiente de correlação de Pearson (ou de Spearman) entre os elementos correspondentes das matrizes A e B , que produz o valor e_o quando calculada para os valores observados. A seguir permutam-se linhas e colunas de uma das matrizes, um número N suficientemente grande, e obtêm-se os valores da estatística dos dados aleatorizados (e_a). O p -valor é dado pela proporção de vezes que a estatística $e_a > e_o$ (133,134,135). (Metodologia geo espacial orientada pela Prof. Denise Viola).

3-Fatores de risco e de proteção e evolução clínica dos pacientes:

Para a análise descritiva, as variáveis categóricas foram expressas através de suas proporções. Calculou-se médias e desvios-padrão para as variáveis contínuas com distribuição normal e medianas e quartis para as não-normais.

Para verificar o efeito dos alelos na chance de desenvolver aplasia medular, as frequências de cada alelo foram comparadas entre o grupo controle e as amostras de pacientes vítimas de aplasia medular em Salvador, Curitiba e na amostra geral (Salvador e Curitiba). Foi utilizado o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, conforme a aplicabilidade, e os resultados foram apresentados como Odds Ratio (OR) e seus respectivos Intervalos de Confiança (IC) de 95%. Os valores de p foram ajustados pelo método de Bonferroni¹ (p significativo $< 0,0016$).

¹ Dunn, O. J. (1961). "Multiple Comparisons Among Means". Journal of the American Statistical Association 56 (293): 52-64.

A probabilidade estimada de encontrar um doador compatível, segundo o número de doadores testados, na amostra estudada, foi obtida por Regressão Logística, tendo como variável dependente a presença de algum (em qualquer número) doador compatível e o número de doadores testados como variável independente. Para esta mesma análise, foi ainda desenvolvido um modelo alternativo, com ponderação dos casos conforme o número de doadores compatíveis encontrados (peso 2 se 2 doadores compatíveis [8 casos] e peso 3 se 3 doadores compatíveis [2 casos]).

Para a análise de sobrevida em 2 anos/ 24meses, foram considerados os óbitos (data do óbito) por qualquer causa. Foram censurados, ao final do estudo, os pacientes que permaneceram vivos após x anos/meses do diagnóstico da aplasia de medula. Para os pacientes com acompanhamento perdido, a data da censura foi aquela do último registro em prontuário médico ou último contato dos pesquisadores. Foram calculadas as funções de sobrevida empregando-se o método de Kaplan-Meier², através do qual foram estimadas curvas agrupando os pacientes segundo as variáveis de interesse selecionadas para o estudo e utilizando o teste de Log-rank (Mantel-Cox)³ para comparação das funções de sobrevida entre os subgrupos. Na avaliação multivariável dos fatores prognósticos, o HLA foi considerado a variável independente de interesse, e foram calculados as *hazard ratios* (HR) com Intervalo de Confiança (IC) de 95%, seguindo-se o modelo de riscos proporcionais de Cox⁴. As potenciais variáveis confundidoras identificadas pela análise univariada com p até 0,10 foram incluídas nos modelos multivariados. A proporcionalidade do modelo de Cox foi verificada por métodos gráficos e a partir do teste diagnóstico de resíduos de Schoenfeld⁵. A linearidade das variáveis contínuas incluídas no modelo final foi verificada pela análise gráfica dos resíduos de Martingale, calculados a partir de um modelo com exclusão da variável em análise.

² Kaplan E, Meier P: Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. J Am Stat Assoc 1958, 53:457-81.

³ Mantel N: Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. Cancer Chemother Rep 1966, 50:163-70.

⁴ Cox D: Regression Models and Life-Tables. Journal of the Royal Statistical Society, Series B 1972, 34:187-220.

⁵ Schoenfeld, D. Partial residuals for the proportional hazards model. Biometrika 1982; 69:51-55.

Todos os testes foram bicaudados e os dados foram analisados com auxílio do software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 20.0, Chicago, IL, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS CLINICO-EPIDEMIOLOGICOS

5.1.1 PERFIL DOS PACIENTES

Na análise clínica epidemiológica foram inicialmente avaliados um total de 215 pacientes com o diagnóstico confirmado de anemia aplástica. Destes 45,1% era composto por mulheres e 54,9% por homens, com idade média de 23,4 anos.

AMOSTRA

Número total de pacientes:

Bahia: 215 pacientes

BAHIA:

Sexo (n=213): mulheres = 45,1%; homens = 54,9%

Idade média (n=158): 23,4 ± 12,3

5.1.2 DISTRIBUICAO DOS CASOS DE AA POR FAIXA ETARIA

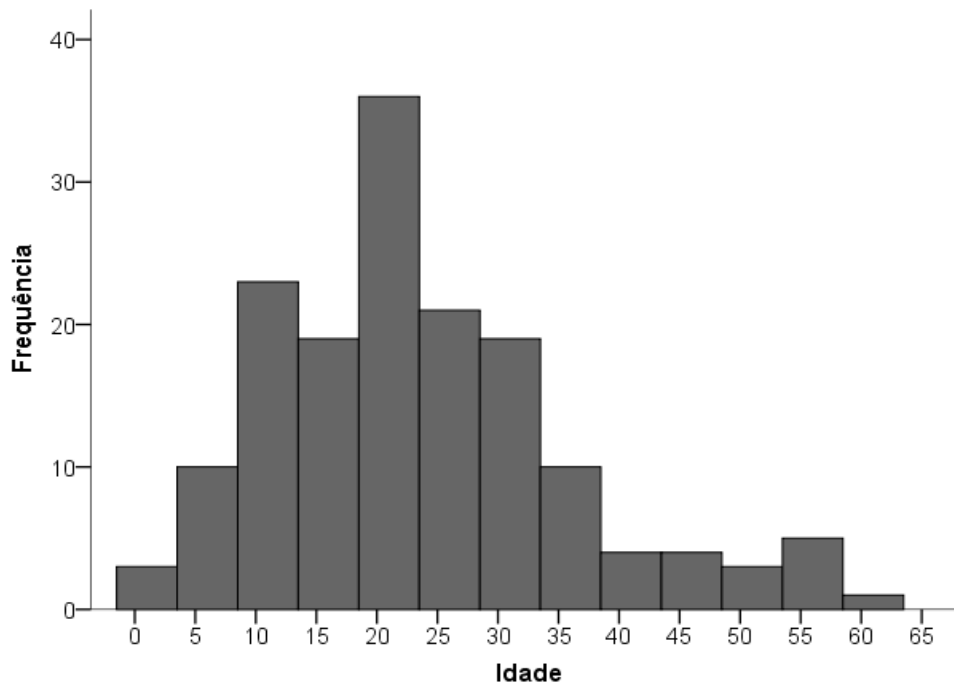


Figura 9. Frequência dos casos de aplasia em Salvador, Bahia segundo a idade.

A idade média da anemia aplasia na Bahia vai de encontro aos dados da literatura, de 23,4 anos (+-12,3). Mais de 70% dos casos encontra-se em faixa etária entre 10 e 35 anos, confirmando os dados de sua forte incidência nos adolescentes e adultos jovens. Apesar da tendência a um segundo pico etário ao redor dos 55 anos, muito descrito em algumas series, este achado nao foi estatisticamente significativo. A distribuição finalizou como distribuição unimodal.

5.1.3 PROJECAO DE INCIDENCIA DE CASOS NOVOS DE AA NA BAHIA, POR MILHAO DE HABITANTE, POR ANO.

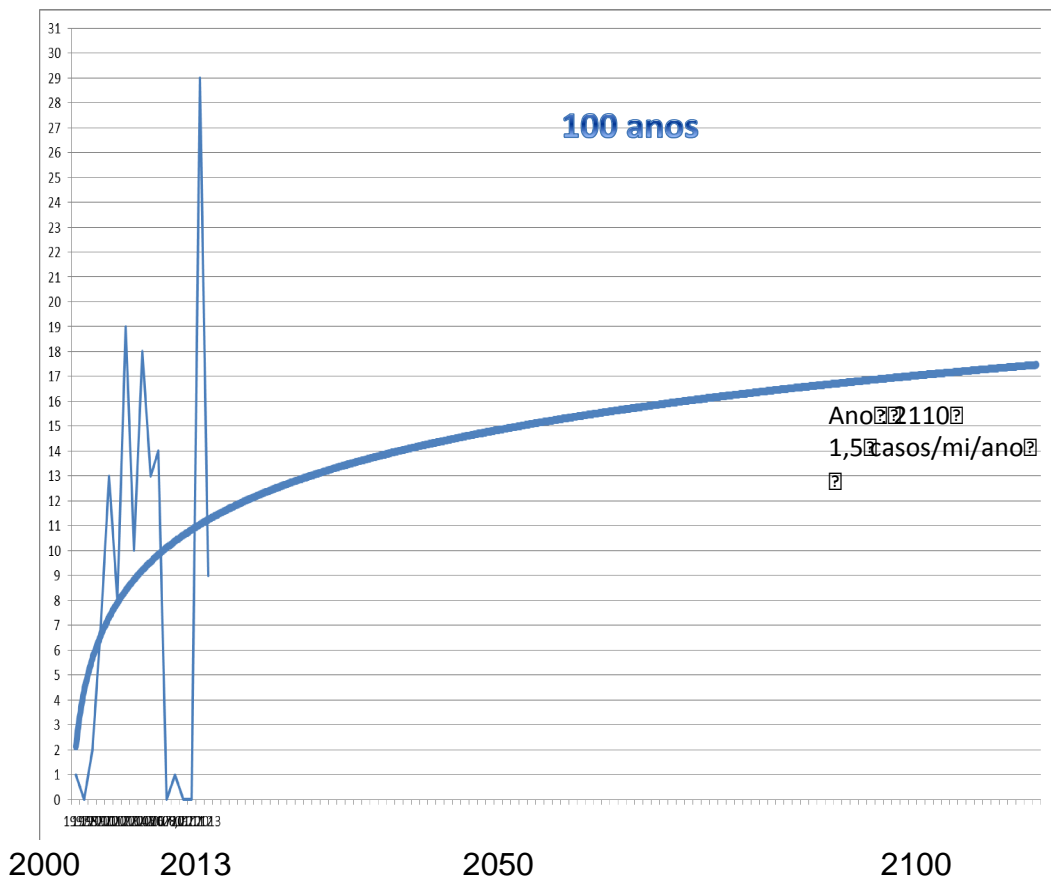


Figura 10: projeção de número de casos por ano, no estado da Bahia, ao longo dos anos (casos registrados).

Este gráfico tem valor apenas ilustrativo. não tem poder estatístico, porque não podemos pressupor que a população do estado não se altere, bem como a incidência da anemia aplásica. Entretanto, se baseássemos nesses pressupostos, utilizando regressão baseada em modelo exponencial, atingiríamos 1,5 casos/milhão/ano em 100 anos (usando para a construção da curva os casos registrados, que não sabemos em nosso estado que percentual representa de todos os casos).

5.1.4 DISTRIBUICAO DOS CASOS DE ANEMIA APLASICA, PELA CIDADE DE PROVENIENCIA DO PACIENTE

Bahia:

- -Área: 567.295km²
- População: 14,175,000; cidades no Estado: 417
- Amostra: 188 casos com certitude de proveniência.
- Período da analise: 2000-2011
- Total de cidades diferentes : 76 cidades

Casos por município	Número de municípios
1	55
2	15
3	3
>3	3

Utilizando-se os teste de aleatorização utilizando matriz de Mantel, e Semivariograma e envelope simulado, não foi mostrado padrão de distribuição dos casos dentre os municípios do estado da Bahia.ou seja, distribuição aleatória dos casos.

City	Provincience	Latitude	Longitude	Population
ACAJUTIBA	1	-11,66222	-38,01722	14322
ALAGOINHAS	2	-12,13556	-38,41917	130095
APUREMA	1	-13,85639	-39,74389	7443
ARATACA	1	-15,26333	-39,41444	11218
BARRA DO MENDES	1	-11,81	-42,05861	13610
BARREIRAS	1	-12,15278	-44,99	131849
BOM JESUS DA LAPA	1	-13,255	-43,41806	54421
BREJÕES	1	-13,10444	-39,79583	15344
CACHOEIRA	1	-12,61833	-38,95583	30416
CAEM	1	-11,09056	-40,43528	12563
CAMAÇARI	1	-12,6975	-38,32417	161727
CAMPO FORMOSO	1	-10,5075	-40,32139	61942
CANARANA	1	-11,68472	-41,76889	21665
CANDEIAS	2	-12,66778	-38,55056	76783
CANUDOS	1	-9,89667	-39,02639	13761
CASA NOVA	1	-9,16194	-40,97083	55730
CATU	1	-12,35306	-38,37889	46731
CÍCERO DANTAS	2	-10,6	-38,38333	30934
CONCEIÇÃO DO ALMEIDA	1	-12,77944	-39,17	18912
CRUZ DAS ALMAS	1	-12,67	-39,10194	53049
DIAS D'ÁVILA	1	-12,6125	-38,29694	45333
FEIRA DE SANTANA	4	-12,26667	-38,96667	480949
GANDU	1	-13,74389	-39,48667	27160
GUANAMBI	1	-14,22333	-42,78139	71728
IAÇÚ	1	-12,76722	-40,21167	28501
IBIRAPITANGA	1	-14,16417	-39,37361	13419
ILHÉUS	1	-14,78889	-39,04944	222127
IPIRÁ	1	-12,15833	-39,73722	61746
IRAQUARA	2	-12,24861	-41,61944	18334
ITABERABA	1	-12,5275	-40,30694	58943
ITABUNA	2	-14,78556	-39,28028	196675
ITAGI	2	-14,16278	-40,00611	14629
ITAJUÍPE	1	-14,67806	-39,375	22511
ITAMARI	1	-13,77806	-39,68361	8347
ITAMBÉ	1	-15,245	-40,62444	30850
ITAPARICA	1	-12,88833	-38,67861	18945
ITUBERÁ	2	-13,73222	-39,14917	24133
JACOBINA	2	-11,18056	-40,51833	76492
JEQUIÉ	3	-13,8575	-40,08361	147202
JUAZEIRO	2	-9,41167	-40,49861	174567
JUSSARA	1	-11,04694	-41,96944	15339
LAJE	1	-13,18222	-39,425	19601
LAURO DE FREITAS	1	-12,89444	-38,32722	113543
MACAJUBA	1	-12,13611	-40,36	11474
MACAÚBAS	2	-13,01944	-42,69861	41806
MAIRI	1	-11,71139	-40,14889	20085
MARCIONÍLIO SOUZA	1	-13,00306	-40,53056	10775
MASCOTE	1	-15,56306	-39,3025	16093
MATA DE SÃO JOÃO	1	-12,53028	-38,29917	32568
MOLUNGU DO MORRO	1	-11,96611	-41,63889	15119
MONTE SANTO	1	-10,43778	-39,33278	54552
MUTUÍPE	1	-13,22861	-39,50472	20462
NAZARÉ	1	-13,035	-39,01444	26365
NILO PEÇANHA	1	-13,59944	-39,10694	11213
NOVA SOUTE	2	-11,23333	-38,48333	24405
PAULO AFONSO	1	-9,40611	-38,21472	96499
PORTO SEGURO	1	-16,44972	-39,06472	95721
QUEIMADAS	1	-10,97833	-39,62639	24613
REMANSO	1	-9,62167	-42,08139	36257
RIACHÃO DO JACUÍPE	2	-11,80694	-39,38556	31633
S. FRANCISCO DO COND	2	-12,6275	-38,68	26282
SALVADOR	83	-12,97111	-38,51083	2443107
SANTALUZ	1	-11,25583	-39,37472	30955
SANTA RITA DE CÁSSIA	1	-11,00861	-44,51944	24026
SANTO AMARO	2	-12,54667	-38,71194	58414
SANTO ANTONIO DE JESUS	2	-12,96889	-39,26139	77368
SENHOR DO BONFIM	1	-10,46139	-40,18944	67723
SERRA PRETA	1	-12,16028	-39,33167	17726
TAPEROÁ	1	-13,53806	-39,09861	15933
TEIXEIRA DE FREITAS	1	-17,535	-39,74194	107486
UBATÁ	1	-14,21389	-39,52278	21803
UNA	1	-15,29333	-39,07528	31261
VALENÇA	1	-13,37028	-39,07306	77509
VITÓRIA DA CONQUISTA	13	-14,86611	-40,83944	262494
WENCESLAU GUIMARÃES	1	-13,68694	-39,47944	23926

TOTAL 188

5.2 RESULTADOS- BIOMARCADORES

5.2.1 RESULTADOS -BIOMARCADORES: HLA

Amostra

- Bahia: 215 casos de AA com tipização para HLA CLASSE I E II.
- Paraná: 344 casos de AA com tipização para HLA CLASSE I E II.
- Grupo controle: 3680 doadores voluntários de medula óssea

5.2.2 FREQUENCIA GENOTIPICA DE ANTIGENOS HLA –A EM PACIENES COM APLASIA NOS ESTADOS DA BAHIA E PARANA.

Tabela 4 . Frequência genotípica de antígenos do HLA-A entre pacientes com anemia aplásica em Salvador e Curitiba e Controles.

Alelo do HLA-A	Salvador (n = 215)	Curitiba (n = 344)	Geral (n = 559)	Controles (n = 3680)	OR (95% IC)	p
1	0,140	0,163	0,154	0,145	1,071 (0,836 - 1,372)	0,586
2	0,428	0,465	0,451	0,488	0,861 (0,720 - 1,030)	0,101
3	0,200	0,160	0,175	0,173	1,016 (0,804 - 1,283)	0,897
24	0,102	0,157	0,136	0,137	0,992 (0,765 - 1,285)	0,949
					2,514 (1,528 – 4,137)	
	---	---	0,039	0,016		<0.001
25	0,037	---	---	0,016	2,372 (1,119 - 5,029)	0.024
	---	0,041	---	0,016	2,604 (1,438 – 4,713)	0.0016
30	0,177	0,140	0,154	0,189	0,780 (0,611 – 0,995)	0,046
33	0,107	0,078	0,089	0,078	1,161 (0,848 - 1,590)	0,351
68	0,130	0,116	0,122	0,153	0,767 (0,586 - 1,003)	0,053

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança.

O valor p a ser considerado significativo após ajuste de Bonferroni é $p < 0.0016$

O HLA A25 é fator de risco para desenvolvimento de AAA na Bahia e no Paraná (Tabela 1). No geral aproximadamente 4% dos pacientes com aplasia possuem este fenótipo (controle 1,6%) (OR:**2,514 –IC: 1,528 – 4,137**).

5.2.3 FREQUENCIA GENOTIPICA DE ANTIGENOS HLA –B EM PACIENES COM APLASIA NOS ESTADOS DA BAHIA E PARANA.

Tabela 5. Frequência genotípica de alelos do HLA-B entre pacientes com anemia aplásica em Salvador e Curitiba e Controles.

Alelo do HLA-B	Salvador (n = 215)	Curitiba (n=333)	Geral (n = 548)	Controles (n = 3680)	OR (95% IC)	P
	---	---	0,200	0,145	1,480 (1,178 - 1,859)	<0,001
7	0,219	---	---	0,145	1,648 (1,178 - 2,307)	0,004
	---	0,188	---	0,145	1,375 (1,029 - 1,836)	0,031
8	0,074	0,082	0,079	0,079	0,992 (0,710 - 1,384)	0,961
14	0,060	0,136	0,106	0,107	0,987 (0,738 - 1,321)	0,931
	---	---	0,115	0,232	0,430 (0,327 - 0,565)	<0,0001
15	0,060	---	---	0,232	0,213 (0,121 - 0,375)	<0,0001
	---	0,151	---	0,232	0,585 (0,429 - 0,797)	<0,001
18	0,093	0,088	0,090	0,088	1,017 (0,742 - 1,393)	0,916
35	0,163	0,202	0,187	0,218	0,821 (0,653 - 1,032)	0,091
	---	---	0,119	0,080	1,550 (1,165 - 2,061)	0,003
40	0,042	---	---	0,080	0,503 (0,255 - 0,991)	0,047
	---	0,168	---	0,080	2,328 (1,706 - 3,177)	<0,0001
44	0,140	0,160	0,152	0,201	0,709 (0,554 - 0,908)	0,006
49	0,088	0,061	0,072	0,060	1,199 (0,843 - 1,707)	0,313
51	0,116	0,121	0,119	0,127	0,926 (0,702 - 1,221)	0,585
	---	---	0,048	0,099	0,454 (0,302 - 0,683)	<0,001
53	0,084	---	---	0,099	0,832 (0,508 - 1,365)	0,467
	---	0,024	---	0,099	0,224 (0,110 - 0,456)	<0,0001
58	0,093	0,042	0,062	0,080	0,762 (0,528 - 1,100)	0,146
65	0,102	0,000	0,040	---	---	---

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança.

O valor p a ser considerado significativo após ajuste de Bonferroni é $p < 0.0016$

O HLA B15 é fator protetor para desenvolvimento de AAA na Bahia e no Paraná. No geral aproximadamente 11,5% dos pacientes com aplasia possuem este fenótipo (controle 23,2%). Na Bahia a diferença é ainda maior, onde os pacientes com AAA possuem este fenótipo em apenas 6% dos casos (OR:0,213 -IC:0,121 - 0,375)

5.2.4 FREQUENCIA GENOTIPICA DE ANTIGENOS HLA – DR EM PACIENES COM APLASIA NOS ESTADOS DA BAHIA E PARANA.

Tabela 6. Frequência genotípica de alelos do HLA-DR entre pacientes com anemia aplásica na Bahia e Paraná e controles.

Alelo do HLA-DR	Salvador (n = 202)	Curitiba (n=559)	Geral (n = 761)	Controles (n = 3680)	OR (95% IC)	p
1	---	---	0,127	0,184	0,648 (0,515 - 0,815)	<0,001
	0,134	---	---	0,184	0,684 (0,452 – 1,035)	0,072
	---	0,124	---	0,184	0,625 (0,479 – 0,815)	<0,001
3	---	---	0,167	0,220	0,710 (0,578 - 0,872)	0,0012
	0,168	---	---	0,220	0,717 (0,492 – 1,045)	0,084
	---	0,167	---	0,220	0,707 (0,559 – 0,895)	0,004
4	0,183	0,229	0,217	0,220	0,981 (0,812 - 1,185)	0,842
7	0,218	0,202	0,207	0,246	0,803 (0,664 - 0,972)	0,024
8	---	---	0,096	0,130	0,711 (0,548 – 0,922)	0,010
	0,050	---	---	0,130	0,349 (0,183 - 0,664)	0,0013
	---	0,113	---	0,130	0,851 (0,644 – 1,125)	0,257
9	0,069	0,049	0,054	0,048	1,127 (0,795 - 1,598)	0,502
10	0,005	0,036	0,028	0,048	0,562 (0,355 - 0,889)	0,014
11	0,183	0,251	0,233	0,213	1,120 (0,930 - 1,348)	0,234
13	0,248	0,264	0,260	0,300	0,821 (0,688 - 0,979)	0,028
15	---	---	0,380	0,240	1,939 (1,645 – 2,287)	<0,0001
	0,416	---	---	0,240	2,237 (1,688 - 2,966)	<0,0001
	---	0,367	---	0,240	1,834 (1,520 – 2,214)	<0,0001

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança.

O valor p a ser considerado significativo após ajuste de Bonferroni é $p < 0,0016$

O HLA D15 é fator de risco para desenvolvimento de AAA na Bahia e no Paraná. No geral aproximadamente 38% dos pacientes com aplasia possuem este fenótipo. Na Bahia isto é ainda mais evidente, onde os pacientes com AAA possuem este fenótipo HLA DR15 em 41,6% dos casos (controle 24%), com OR de 2,23 e IC: 1,68-2,9.

5.2.5. GENÓTIPOS HLA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS

Tabela 7. Interpretação do efeito dos antígenos HLA na chance de AA

Alelo	Salvador	Parana	Geral	Interpretação
-------	----------	--------	-------	---------------

RISCO	A25	2,372 (1,119 - 5,029) *	2,604 (1,438 - 4,713) ‡	2,514 (1,528 - 4,137) ‡	Consistente nas amostras
	B7	1,648 (1,178 - 2,307) *	1,375 (1,029 - 1,836) *	1,480 (1,178 - 1,859) ‡	Consistente nas amostras
	B40	0,503 (0,255 - 0,991)	2,328 (1,706 - 3,177) ‡	1,550 (1,165 - 2,061)	Não consistente
	DR15	2,237 (1,688 - 2,966) ‡	1,834 (1,520 - 2,214) ‡	1,939 (1,645 - 2,287) ‡	Consistente nas amostras
PROTEÇÃO	B15	0,213 (0,121 - 0,375) ‡	0,585 (0,429 - 0,797) ‡	0,430 (0,327 - 0,565) ‡	Consistente nas amostras
	B53	0,832 (0,508 - 1,365)	0,224 (0,110 - 0,456) ‡	0,454 (0,302 - 0,683) ‡	Não consistente
	DR1	0,684 (0,452 - 1,035) *	0,625 (0,479 - 0,815) ‡	0,648 (0,515 - 0,815) ‡	Consistente nas amostras
	DR3	0,717 (0,492 - 1,045) *	0,707 (0,559 - 0,895) *	0,710 (0,578 - 0,872) ‡	Consistente nas amostras
	DR8	0,349 (0,183 - 0,664) ‡	0,851 (0,644 - 1,125)	0,711 (0,548 - 0,922)	Não consistente

Os valores são apresentados como odds ratio e seu intervalo de confiança.

‡ valor de $p < 0.0016$; * valor de p não significativo após ajuste de Bonferroni, mas consistente com o resultado na amostra geral com maior tamanho amostral.

Consideramos resultados estatisticamente consistentes, aqueles cuja significância foi observada nas duas coortes. Assim, foram consistes como fatores de risco os HLAs: **A25**, **B7** e **DR15**. Foram considerados consistes como fatores protetores, os HLAs: **B15**, **DR1** e **DR3**.

5.2.6.GENOTIPOS HLA CLINICAMENTE RELEVANTES

Tabela 8. HLA antigen with significant OR ($p < 0,0016$ Borriglione correction) in Bahia Aplastic Anemia Patients, and their clinical interpretation

	Antigen	OR (CI)	Clinical Interpretation
RISK	A25	2,372 (1,119 - 5,029) *	Not Relevant
	B7	1,648 (1,178 - 2,307) *	Not Relevant
	B40	0,503 (0,255 - 0,991)	Not Relevant
	DR15	2,237 (1,688 - 2,966) ‡	RELEVANT
PROTECTIVE	B15	0,213 (0,121 - 0,375) ‡	RELEVANT
	B53	0,832 (0,508 - 1,365)	Not Relevant
	DR1	0,684 (0,452 - 1,035) *	Not Relevant
	DR3	0,717 (0,492 - 1,045) *	Not Relevant
	DR8	0,349 (0,183 - 0,664) ‡	Not Relevant

Consideramos clinicamente relevante os HLAs consistentes (estatisticamente significativos em todas as coortes) e que apresentaram uma frequência fenotípica do HLA de risco acima de 20%, bem como o do controle do fator protetor. Acreditamos que num numero de possibilidades tão vasta como a dos antígenos de HLA (centenas), é muito comum estatisticamente se encontrar relevância estatística de eventos raros (antígenos raros). Assim, o único fator protetor clinicamente relevante foi considerado o HLA-DR15(42% em AA vs 24% no controle) e o protetor o HLA-B15 (6% em AA,24% no controle).

5.2.7.EFEITO DO SINERGISMO ENTRE HLADR15 E HLA-B15

Tabela 9. Percentual de pacientes com AAA na Bahia e Paraná com presença do HLA DR15 w/ou HLA B15

		BAHIA (n=202)	PARANA (n=278)	Geral (BA/PR) (n=480)
- Risco +	DR15+ / B15-	81 (40.1)	88 (31.7)	169 (35.2)
	DR15+ / B15+	3 (1.5)	9 (3.2)	12 (2.5)
	DR15- / B15-	109 (54.0)	148 (53.2)	257 (53.5)
	DR15- / B15+	9 (4.5)	33 (11.9)	42 (8.8)

Os dados são apresentados como n (%).

-Análise descritiva das associações de HLADR15 com HLAB15 (BA/PR/Controle)

5.2.8.EFEITO DO SINERGISMO ENTRE HLADR15 E HLA-B15 (parte 2)

Tabela 10. Percentual de pacientes com AAA na Bahia comparando com controle da Bahia

	AA BAHIA (N 202)	Controle Bahia (N 3680)	p-value
	% (n)	% (n)	
DR15+/B15-	40,1% (81)	22,5% (830)	P<0,0001
DR 15+/B15 +	1,5% (3)	1,5% (52)	P 0,9
DR15 -/B15 -	54% (109)	54% (1987)	P 0,9
DR15-/ B15+	4,4% (9)	22% (801)	P<0,0001

OR (IC) e valor p, para cada perfil de HLA, do grupo Caso comparado ao Controle

	DR15+	DR15-
B15 +	1.052 (0.326 – 3.397) p = 0.933	0.167 (0.085 – 0.328) p < 0.0001
B15-	2.295 (1.714 – 3.073) p < 0.0001	0.990 (0.745 – 1.315) p = 0.944

	AAA group (n=202) frequency	Control (n=3680) frequency	OR (CI) p
DR15positive / B15 positive	0,0148	0,0141	1,052 (0,32-3,3) p=0,933
DR15positive / B15 negative	0,4009	0,225	2,295 (1,71-3,07) p<0,0001
DR15negative / B15 positive	0,0445	0,2179	0,167(0,08-1,31) p<0,0001
DR15negative/ B15 negative	0,5396	0,5421	0,99 (0,74-1,31) p=0,944

O OR independente de DR15+ é 2.295.

O OR independente de B15+ é 0.167.

Se não houvesse interação, o OR associado de DR15+ e B15+ deveria ser 0.383. O OR observado foi de 1.052, ou seja, maior que o esperado.

Isto nos leva às seguintes hipóteses:

a) na presença de B15+, DR15+ se torna de risco ainda maior.

ou

b) na presença de DR15+, B15+ perde um pouco de seu efeito protetor.

5.2.9. Importância do HLADR15 como fator de risco para o desenvolvimento da AA, nas diferentes faixas etárias.

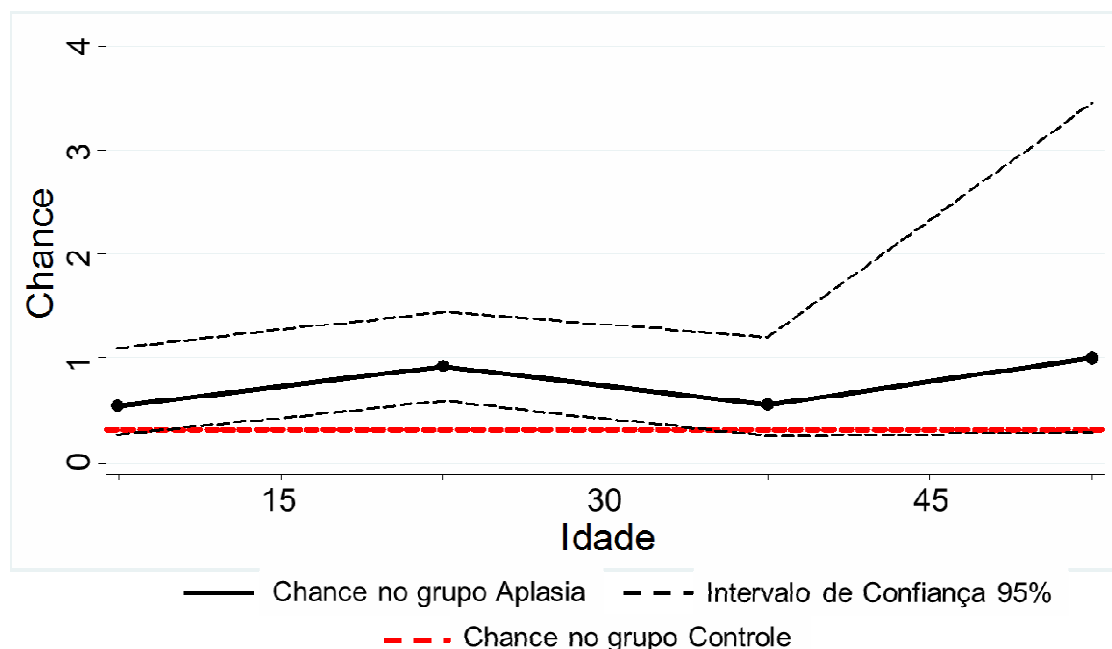


Figura 11. Chance de possuir algum alelo DR15 no grupo de pacientes portadores de Aplasia de Medula em Salvador e no grupo Controle segundo a faixa etária.

Observa-se que na faixa etária de 15 a 30 anos, o HLADR15 apresenta-se significativamente mais aumentado no grupo de pacientes com aplasia na BAHIA. Nesta faixa etária, 49,5% dos casos de aplasia na BAHIA possuem o HLA-DR15. Isto faz-nos supor, que nesta faixa etária (a faixa de maior incidência da doença), este HLA seja ainda mais relevante. Indiretamente podemos inferir que a doença tenha realmente um mecanismo imunomediado importante, e que nesta faixa etária, este mecanismo imunológico seja ainda mais relevante para a manifestação da doença.

5.2.10. Importância do HLA B15 como fator de risco para o desenvolvimento da AA, nas diferentes faixas etárias.

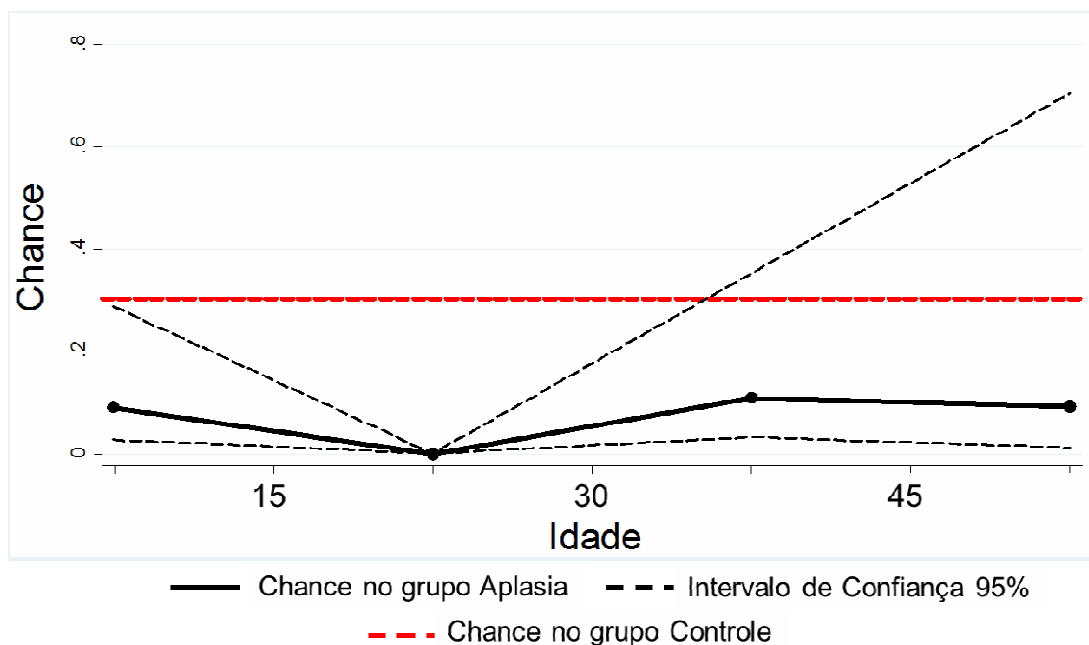


Figura 12. Chance de possuir algum alelo B15 no grupo de pacientes portadores de Aplasia de Medula em Salvador e no grupo Controle segundo a faixa etária

Gráfico 3. Observa-se que na faixa etária de 15 a 30 anos, o HLAB15 apresenta-se significativamente menos frequente no grupo de pacientes com aplasia na BAHIA. Nesta faixa etária, não foi identificado nenhum (ZERO) caso de paciente com aplasia portador do HLA-B15. Isto corrobora a hipótese, que nesta faixa etária (a faixa de maior incidência da doença), este HLA seja ainda mais relevante na fisiopatogenia. Indiretamente podemos inferir que a doença tenha realmente um mecanismo imunomediado importante, e que nesta faixa etária, este mecanismo imunológico seja ainda mais relevante para a manifestação da doença.

5.3 Resultados - Biomarcadores: polimorfismo do gene da citocina Interferon-gamma

5.3.1. AMOSTRA:

BAHIA:

- 30 casos consecutivos de pacientes com AAA do estado da Bahia
- 116 controles, doadores sadios do estado da Bahia

5.3.2. Frequência fenotípica e genotípica do polimorfismo de IFN-gamma nos pacientes com Aplasia

Tabela 11. Frequência Fenotípica de polimorfismo de IFN-gama entre pacientes com anemia aplásica e controles.

Fenótipo	Pacientes (n = 26)	Controles (n = 116)	OR (95% IC)	p
TT	0,154	0,181	0,823 (0,256 - 2,638)	0,743
TA	0,385	0,353	1,143 (0,476 - 2,748)	0,765
AA	0,462	0,466	0,984 (0,419 - 2,309)	0,971

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança.

Tabela 12. Frequência Genotípica de polimorfismo de IFN-gama entre pacientes com anemia aplásica e controles.

Alelo	Pacientes (n = 52)	Controles (n = 232)	OR (95% IC)	p
T	0,346	0,358	0,950 (0,506 - 1,787)	0,875
A	0,654	0,642	1,052 (0,560 - 1,978)	0,875

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança.

Diferentemente da literatura não encontramos diferença alguma entre os pacientes com AA e o grupo controle do estado da Bahia, no que diz respeito aos fenótipos AA, AT e TT, bem com relação às frequências dos alelos T e A. Em nossa população o polimorfismo não se mostrou um fator de risco ou proteção para a doença.

5.3.3. Associação entre fenótipo do polimorfismo para o gene do IFN - gamma e a presença do HLA-DR15

Tabela 13. Association between Phenotype TT (versus TA or AA) IFN-gamma phenotype and the presence of HLA-DR15.

		Phenotype TT		Total
		Yes	No	
DR15	Yes	1 (33.3)	4 (33.3)	5 (33.3)
	No	2 (66.7)	8 (66.7)	10 (66.7)
Total		3 (100.0)	12 (100.0)	15 (100.0)

p = 1.000 (Fisher exact test).

Não houve associação entre os polimorfismos de citocinas e a presença do HLA-DR15. Em nossa coorte não há interação e sinergismo, entre esses mecanismos ligados a AAA.

5.4 Tratamento da Anemia Aplásica

Amostra:

106 pacientes tratados

5.4.1. Probabilidade de se encontrar doador X número de irmãos disponíveis a serem testados (1)

Tabela 14. Probabilidade de encontrar um doador compatível segundo o número de doadores testados - Bahia

Número de doadores testados	Número de pacientes	Probabilidade observada na amostra	Probabilidade estimada †	Probabilidade estimada ‡
0	25	0	0	0
1	26	0,346	0,247	0,245
2	42	0,333	0,307	0,316
3	42	0,405	0,374	0,397
4	28	0,464	0,446	0,484
5	23	0,565	0,520	0,572
6	10	0,800	0,594	0,655
7	6	0,167	0,663	0,730
8	3	1,000	0,726	0,794
9	2	0,000	0,782	0,846

† Regressão logística, tendo como variável dependente a presença de algum (em qualquer número) doador compatível e o número de doadores testados como variável independente. Teste de Hosmer-Lemeshow: $p = 0,127$. Odds Ratio (para cada doador a mais testado): 1,35 (1,15 – 1,57), $p < 0,001$.

‡ Modelo semelhante, porém com ponderação dos casos conforme o número de doadores compatíveis encontrados (peso 2 se 2 doadores compatíveis e peso 3 se 3 doadores compatíveis). Teste de Hosmer-Lemeshow: $p = 0,092$. Odds Ratio (para cada doador a mais testado): 1,42 (1,22 – 1,66), $p < 0,001$.

A maior parte dos pacientes com aplasia tem 2 ,3 e 4 irmãos. Vimos que na pratica eles não seguem as regras de probabilidade, e se observa menos irmãos compatíveis do que o esperado (em todas as faixas de numero de irmãos). Uma possibilidade seria as diferentes paternidades, muito comuns em nosso meio. Em nossa pratica cotidiana, por dificuldades e questões locais,

como o tempo entre diagnóstico e tratamento já é acima do ideal, e o tempo de descoberta de possível doador aparentado sua compatibilidade HLA elevado, e o preparo do doador, temos recomendado que se inicie prontamente a imunossupressão. Temos na maioria das vezes encurtado muito o tempo entre diagnóstico e tratamento, e sabidamente este tempo interfere nas respostas clínicas dos pacientes com AAA. Acreditamos que tal prática poderia ser padronizada nas cidades e países que tem as nossas mesmas dificuldades.

5.4.2. Probabilidade de se encontrar doador X numero de irmãos disponíveis a serem testados (2)

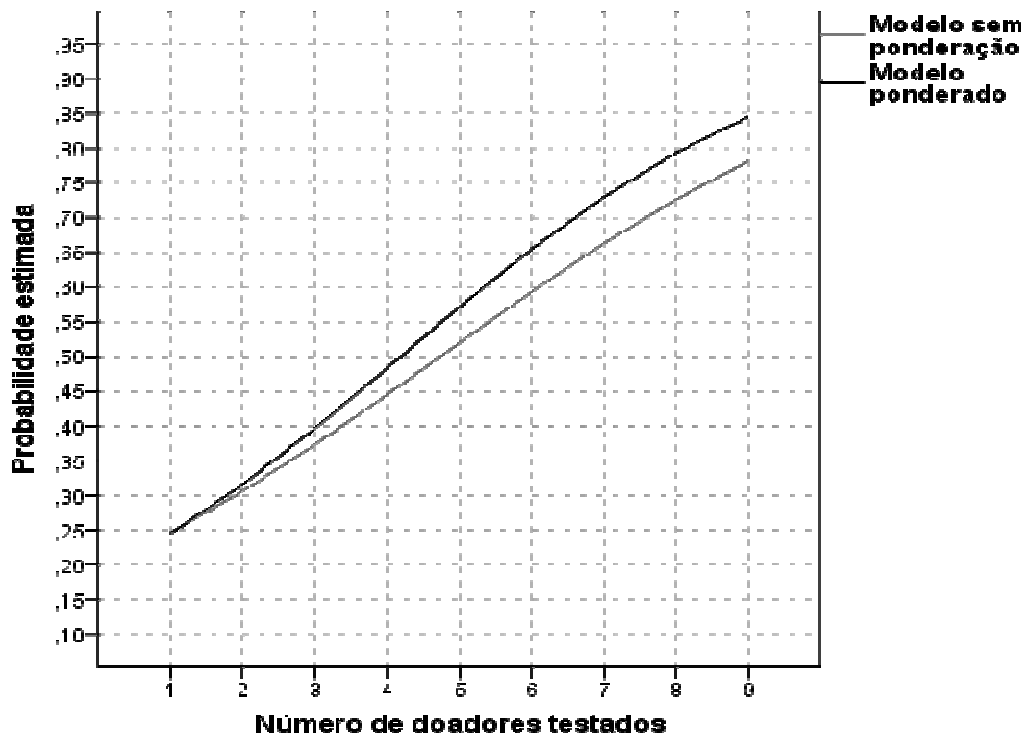


Figura 13. Probabilidade ^a de encontrar um doador compatível segundo o número de doadores testados – Salvador.
^a Probabilidades estimadas obtidas por meio de Regressão logística.

Tabela 15: Número de Irmãos Compatíveis por número de potenciais doadores

Número de Pacientes (207)	Doadores possíveis (*) (n)	% Irmãos Compatíveis
25	0	0
26	1	34%
42	2	33%
42	3	40%
28	4	46%
23	5	56%
10	6	80%
6	7	16%
3	8	10%
2	9	0%

5.3.3 Análise descritiva dos pacientes submetidos ao tratamento de anemia aplásica no HC/UFBA-Hemoba

Tabela 16. Características demográficas da amostra (n=106)

Características	n (%)
Idade (mediana e quartis) (n=98)	21 (16 -30)
<15 anos	22 (22.4)
16-30	54 (55.1)
31-45	14 (14.3)
>45	8 (8.2)
Cor (n=59)	
Branco	8 (13.6)
Pardo	38 (64.4)
Preto	13 (22.0)
Sexo masculino (n=106)	63 (59.4)
Natural de Salvador (vs interior do estado) (n=69)	20 (29.0)
Procedente de Salvador (vs interior do estado) (n=88)	31 (35.2)

Os dados são apresentados como *n* (%), exceto se especificado.

Tabela 17. Caracterização da patologia e manejo terapêutico (n=106)

Características	n (%)
Exposição a algum agente (n=46)	14 (30.4)
Agrotóxicos	1 (7.1)
Amônia/enxofre	1 (7.1)
Benzeno e outros solventes	2 (14.3)
Cola de sapateiro(outros solventes)	1 (7.1)
Ecstasy e anabolizante	1 (7.1)
Indústria de tecidos	1 (7.1)
Organofosforados	1 (7.1)
Pesticidas	3 (21.4)
Querosene e outros inflamáveis	1 (7.1)
Ignorado	2 (14.3)
Gravidade (n=88)	
Não severa	19 (21.6)
Severa	58 (65.9)
Muito severa	11 (12.5)
Exames laboratoriais (mediana e quartis)	
Hemoglobina (n=83)	6.6 (5.1 – 7.4)
Volume Corpuscular Médio (n=60)	95.0 (87.9 – 104.7)
Leucócitos (n=82)	2.775 (1.900 – 3.340)
Neutrófilos (n=71)	600 (360 – 1.024)
Linfócitos (n=73)	1.600 (1.300 – 2.290)
Plaquetas (x 10 ³) (n=81)	15.0 (8.0 – 26.5)

Tabela 18. Caracterização da patologia e manejo terapêutico (n=106)

Características	n (%)
Tratamento (n=99)	
<i>Ciclosporina A</i>	69 (69.7)
Ciclosporina A isolada	45 (45.5)
Ciclosporina A e Globulina Antitimocítica	2 (2.0)
Ciclosporina A e Prednisona	22 (22.2)
<i>Transplante de Medula Óssea</i>	24 (24.2)
Outros	6 (6.1)
Tempo de seguimento total (meses) (mediana e quartis)	37.5 (12.8 – 85.5)

Os dados são apresentados como *n* (%), exceto se especificado.

5.4.4 Análise da sobrevida e fatores prognóstico no tratamento da anemia aplásica

5.4.4.1. Curva de sobrevida global – (24 meses) independente do tipo de tratamento

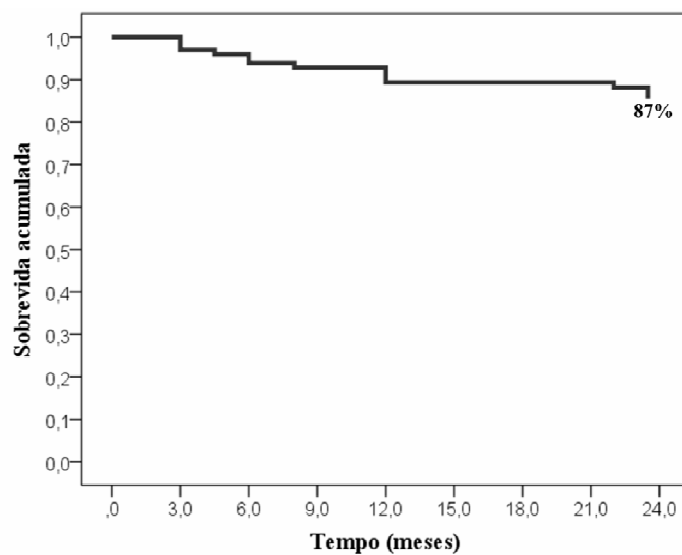


Figura 14. Curva de sobrevida geral em dois anos.

A curva de sobrevida geral em dois anos de pacientes com aplasia medular mostra uma sobrevida média de 22.2 anos (IC 95% 21.1 – 23.2). Aos 24 meses 87% dos pacientes, independente do tratamento estavam vivos.

5.4.4.2. Curva de sobrevida global – 5 anos independente do tipo de tratamento

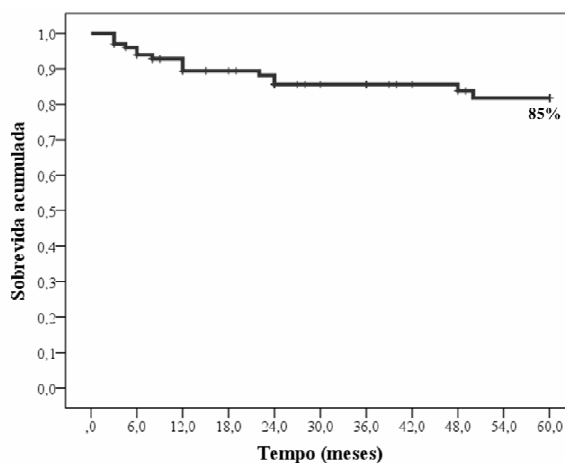


Figura 15. Curva de sobrevida geral em 5 anos.

A curva de sobrevida geral em cinco anos de pacientes com aplasia medular mostra uma sobrevida média de 52,6 anos (IC 95% 49,0 – 56,1). Cerca de 85% dos pacientes estavam vivos aos 5 anos .

Análises univariável: Inicialmente, seguem as curvas de sobrevida de Kaplan-Meier não ajustadas que não apresentaram significância estatística:

5.4.4.3. Curva de sobrevida global – (24meses): TMO x CSA

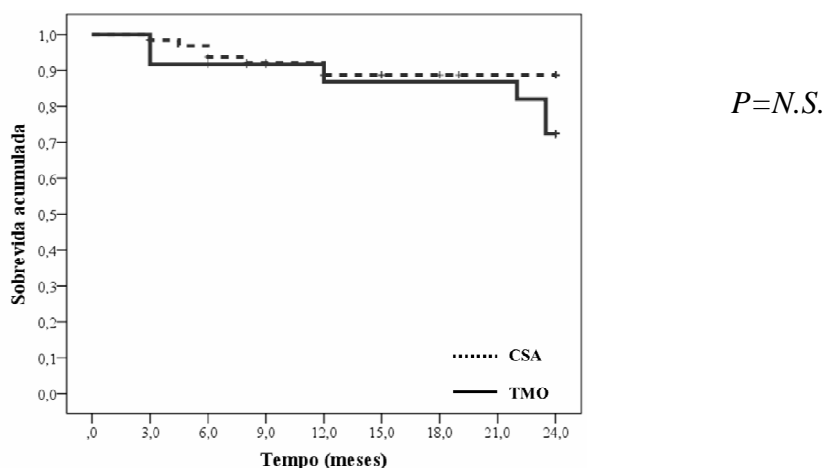


Figura 16. Curva de sobrevida global em 2 anos (TMO vs CSA)

A curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular segundo o manejo terapêutico (CSA vs TMO). Teste Log-Rank, $p=0.106$. Não houve diferença aos 24 meses, em termos de SG, com relação ao tratamento realizado.

5.4.4.4. Curva de sobrevida global – (5 anos/60 meses): TMO x CSA

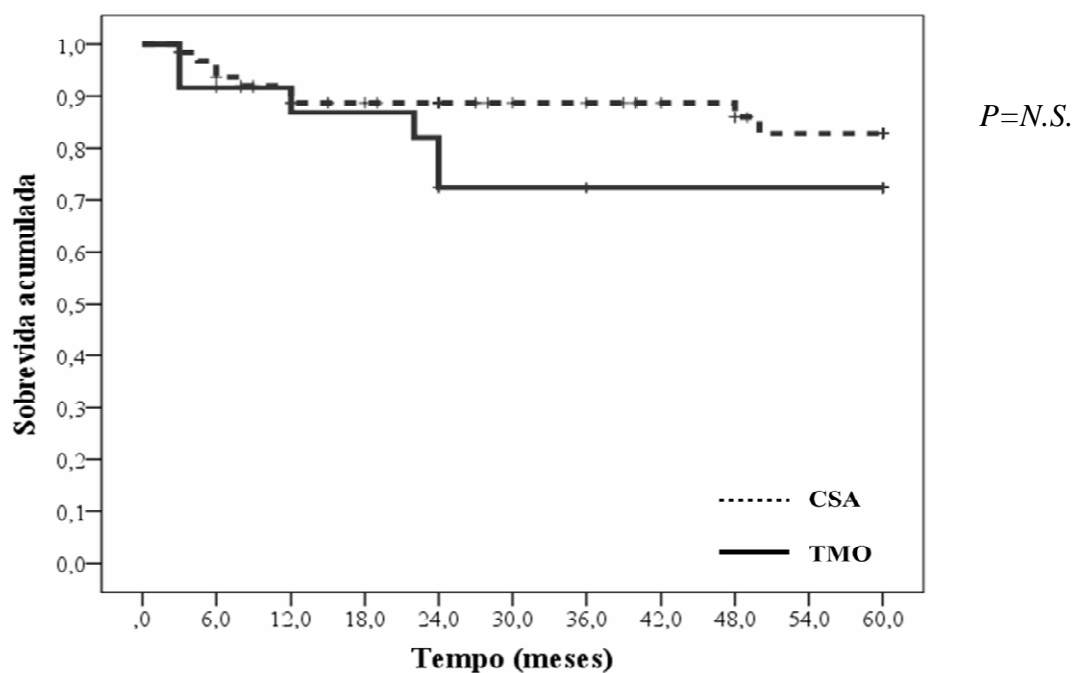


Figura 17. Curva de sobrevida em cinco anos de pacientes com aplasia medular segundo o manejo terapêutico (CSA vs TMO). Teste Log-Rank, $p=0.235$.

Não houve diferença aos 60 meses, em termos de sobrevida global com relação ao tratamento realizado.

5.4.4.5. Curva de sobrevida global em 24 meses: Sexo M vs Sexo F independente do tipo de tratamento

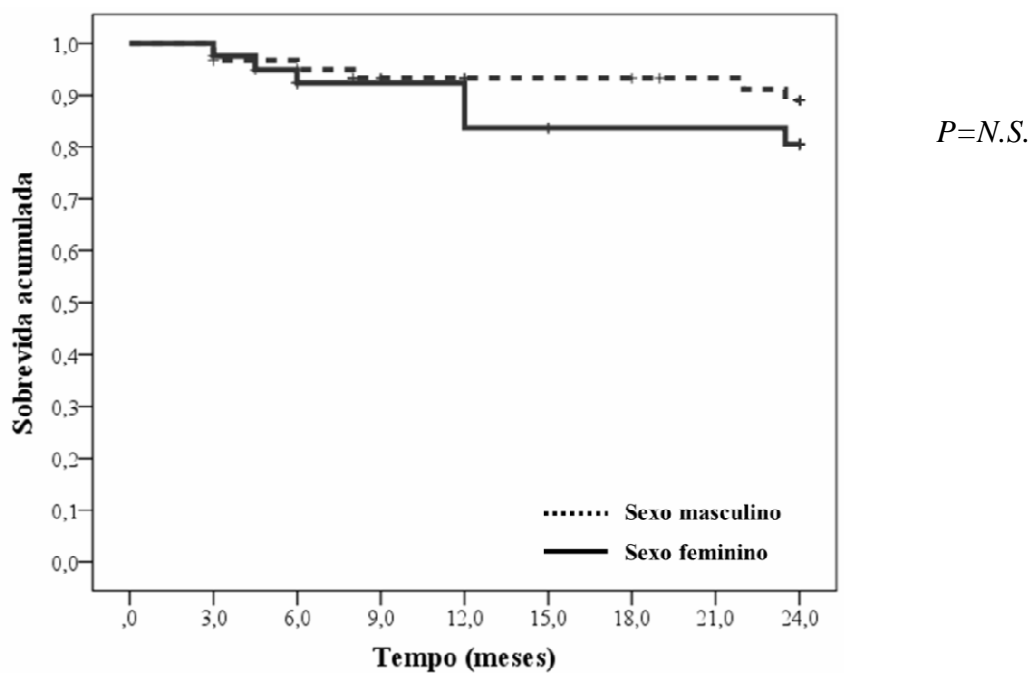


Figura 18.. Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular segundo o sexo. Teste Log-Rank, $p=0.271$.

Não houve diferença aos 24 meses, em termos de SG, com relação ao gênero.

5.4.4.6. Curva de sobrevida global – (24meses): Salvador x Interior independente do tipo de tratamento

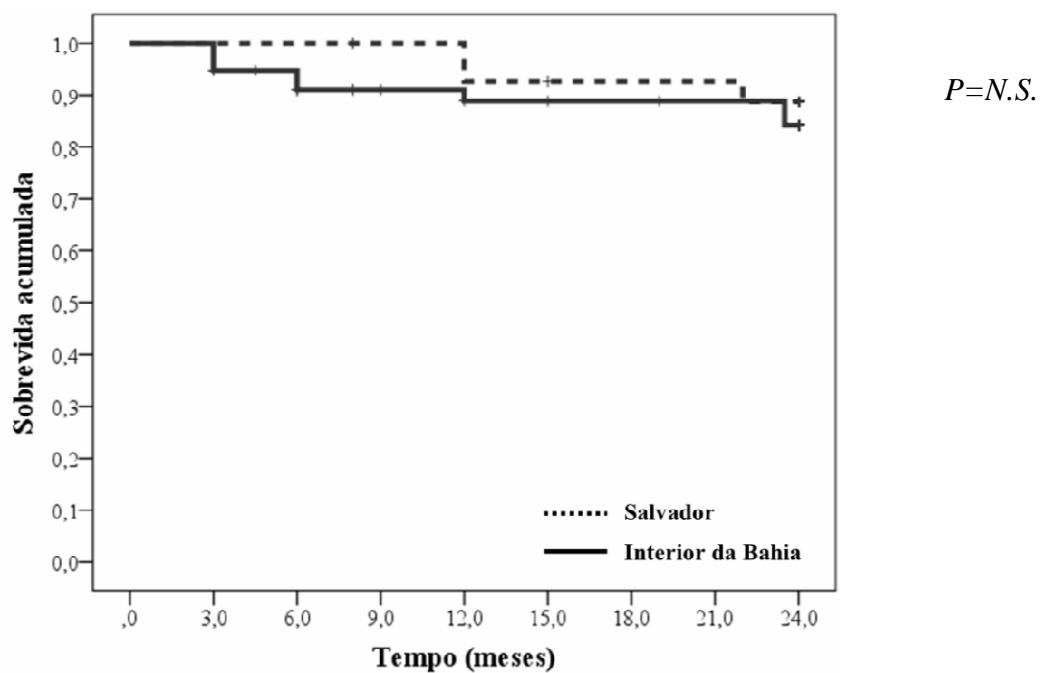


Figura 19 . Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular segundo a procedência. Teste Log-Rank, $p=0.521$.

Não houve diferença aos 24 meses, em termos de SG, com relação à proveniência do paciente.

5.4.4.7. Curva de sobrevida global – (24meses): AA idiopática vs Exposição independente do tipo de tratamento

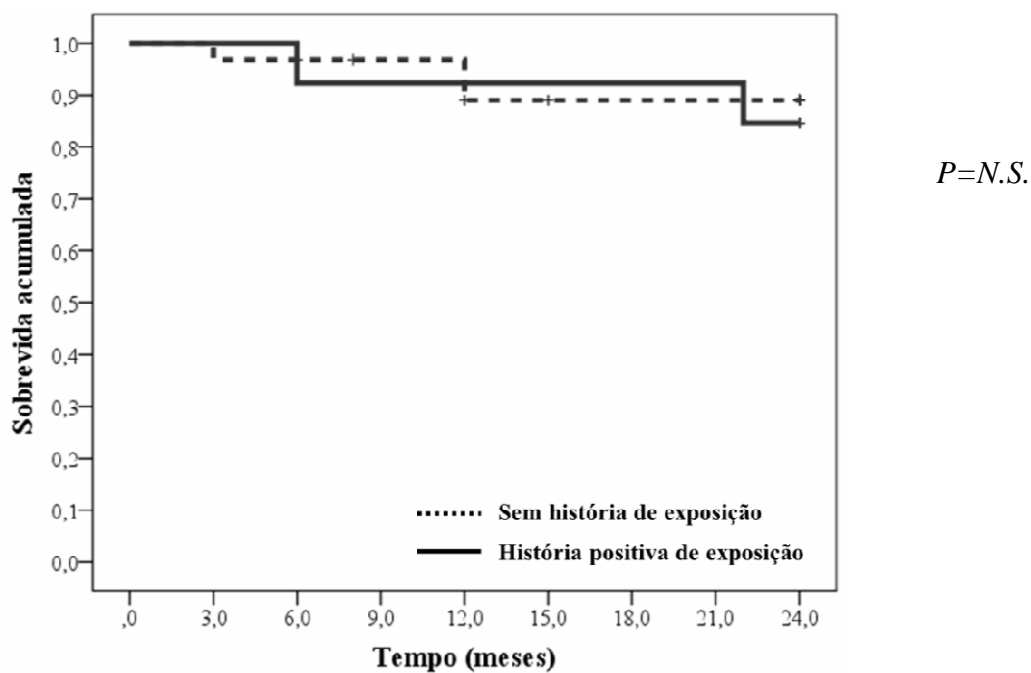


Figura 20. Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular segundo a exposição a algum agente exógeno. Teste Log-Rank, $p=0.725$.

Não houve diferença aos 24 meses, em termos de SG, com relação AA idiopática ou com causa exógena.

**5.4.4.8. Curva de sobrevida global – (24meses): HLADR15+ vs DR15-
(independente do tipo de tratamento)**

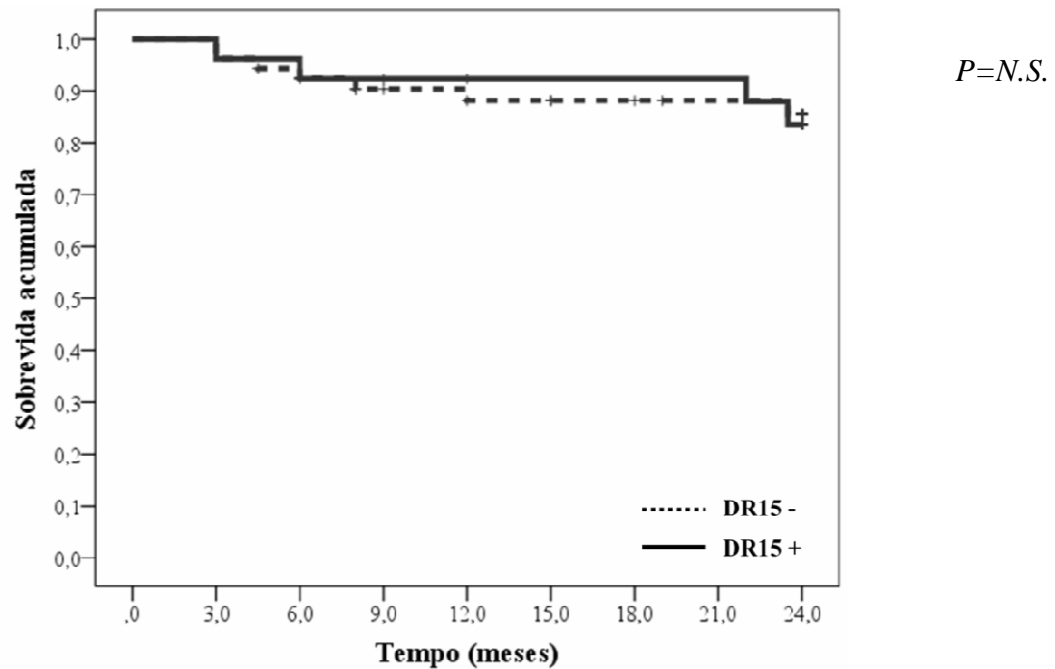


Figura 21. Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular segundo o status HLA-DR15. Teste Log-Rank, $p=0.902$.

Não houve diferença aos 24 meses, em termos de SG, com relação à presença ou não do HLADR15.

5.4.4.9. Curva de sobrevida global – (24 meses): baseado na resposta aos 4,5 meses vs Não Resposta aos 4,5 meses independente do tipo de tratamento

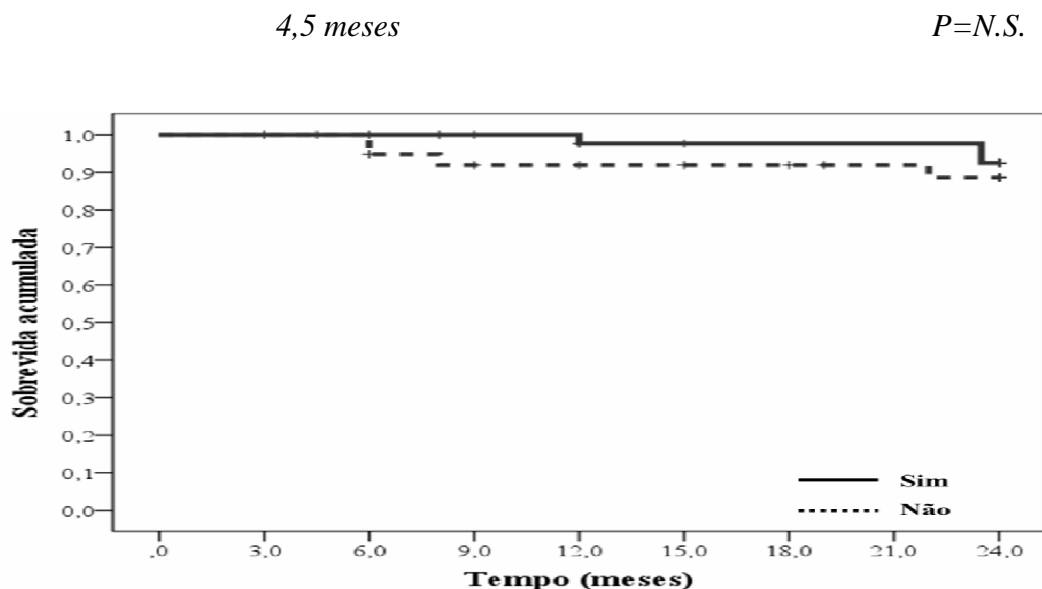


Figura 22 . Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular segundo a resposta em 04 meses e meio. Teste Log-Rank, $p=0.446$.

Obs.: Resposta SIM= resposta completa ou parcial

Resposta Não= vivo porém, sem resposta

Obs2.: óbitos aos 4,5 meses foram excluídos

As próximas seções apresentam apenas as curvas de sobrevida de Kaplan-Meier não ajustadas que apresentaram valor de p para o teste Log-Rank (Mantel-Cox) de até 0,1.

5.4.4.10. Curva de sobrevida global – (24meses): por gravidade da AA independente do tipo de tratamento

P=0,005

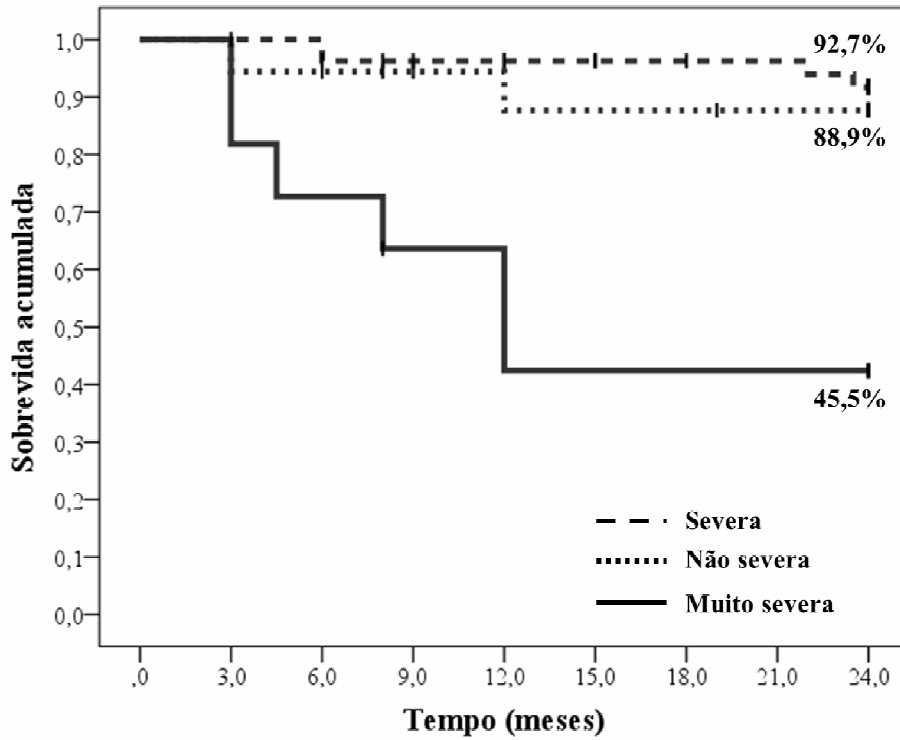


Figura 2. Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular segundo a gravidade. Teste Log-Rank, $p=0.005$.

A AA muito severa teve pior desfecho ($p<0,005$). Apenas ao redor de 40% dos pacientes com AA muito severa estavam vivos aos 24 meses, enquanto que ao redor de 90% dos pacientes com AA severa/não severa estavam vivos neste seguimento (quando não se analisou o tipo de tratamento submetido).

5.4.4.11. Curva de sobrevida global geral- (24 meses): por número de neutrófilos: >315/mm vs <315/mm independente do tipo de tratamento

P=0,001

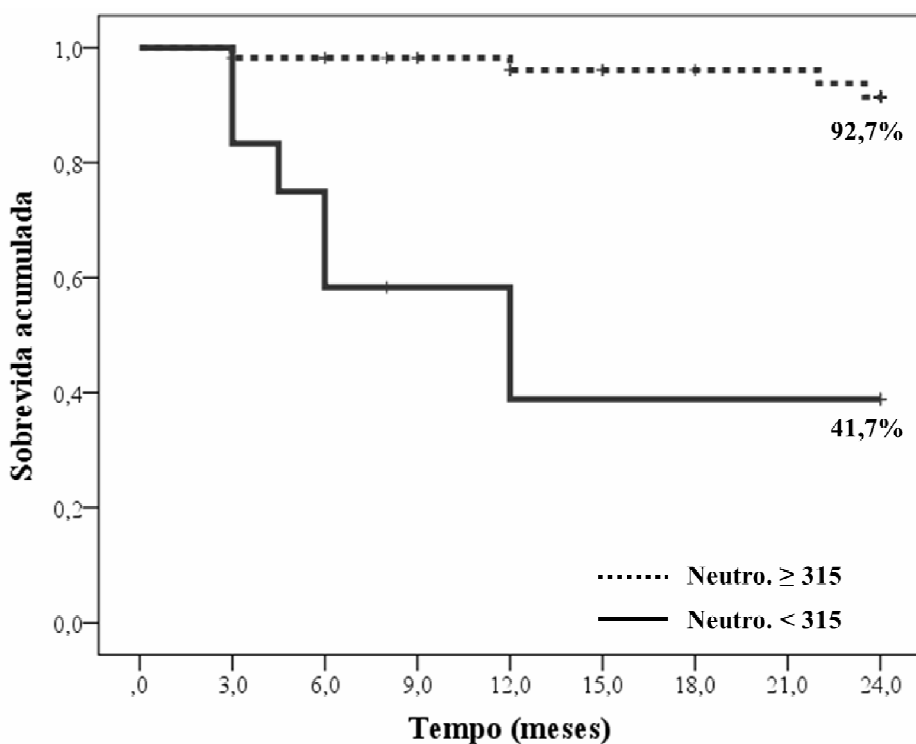


Figura 24. Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular segundo o número de Neutrófilos (Neutro.). Teste Log-Rank, $p < 0,001$.

Em análise por regressão de Cox univariada para o número de neutrófilos como variável contínua, obtém-se um HR = 0,998 (0,996 – 0,999), $p = 0,034$. Para categorizar e compor o gráfico, foi realizada uma análise de curva ROC, a qual definiu o número de neutrófilos de 315 como melhor ponto de corte para predição do desfecho. Pacientes com neutrófilos abaixo de 315 tiveram pior desfecho, estando vivos aos 24 meses apenas 41%.

5.4.4.12. Curva de sobrevida global geral- (24 meses): por gravidade da doença em pacientes tratados com imunossupressão baseado em CSA

P=0,001

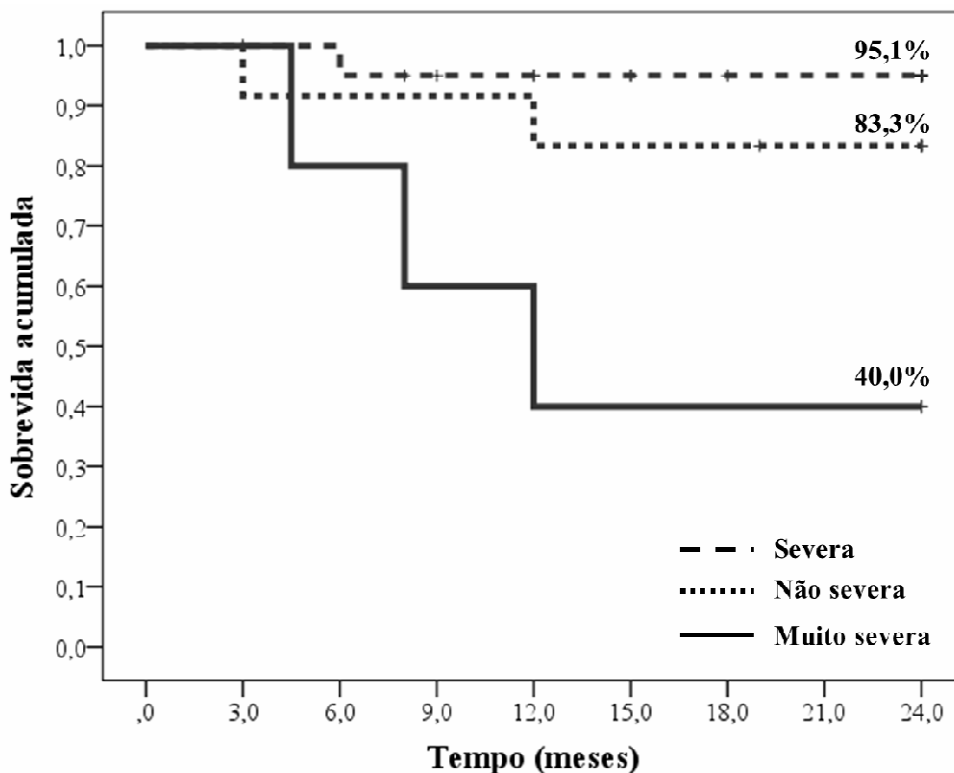


Figura 25 . Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular tratados com CSA segundo a gravidade. Teste Log-Rank, $p=0.001$.

Apenas ao redor de 40% dos pacientes com AA tratados com imunossupressão baseada em ciclosporina com forma muito severa estavam vivos aos 24 meses, enquanto que ao redor de 90% dos pacientes com AA severa/nao severa estavam vivos neste seguimento.

5.4.4.13. Curva de sobrevida global geral- (24meses): por contagem de neutrófilos maior ou menos que 315/mm, em pacientes tratados com imunossupressão baseado em CSA

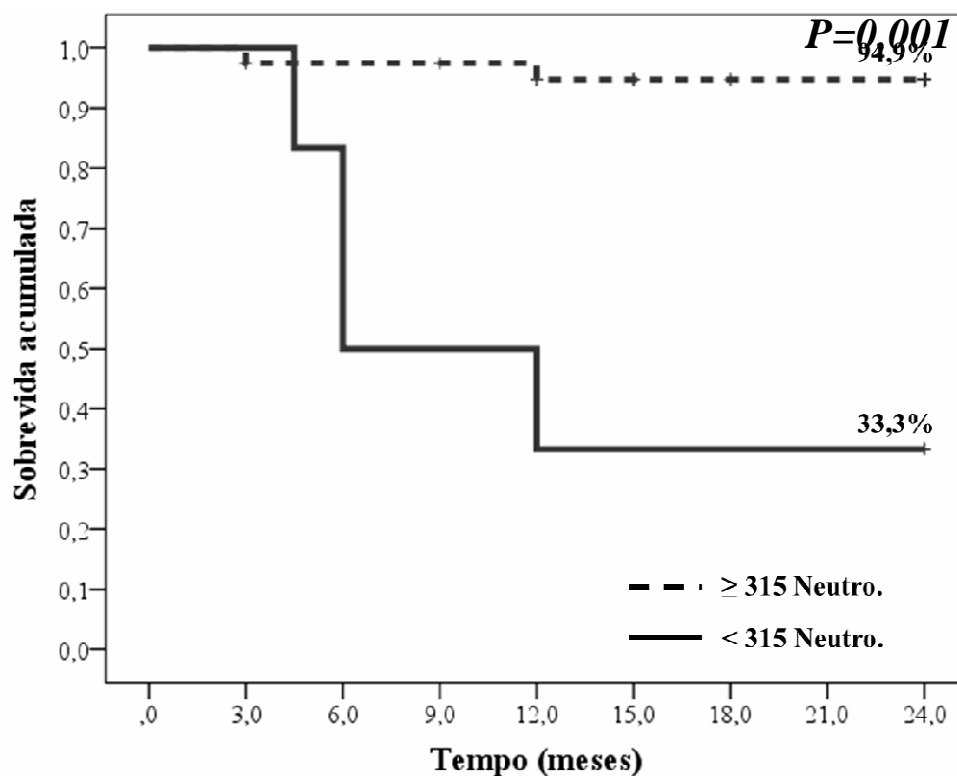


Figura 26. Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular tratados com CSA segundo a contagem absoluta de Neutrófilos. Teste Log-Rank, $p < 0.001$.

Apenas ao redor de 30% dos pacientes com AA tratados com imunossupressão baseada em ciclosporina com neutrófilos abaixo de 315/mm, estavam vivos aos 24 meses, enquanto que ao redor de 95% dos pacientes com AA com neutrófilos acima de 315/mm estavam vivos neste seguimento .

5.4.4.14. Curva de sobrevida global – (24meses): HLADR15+ vs DR15-, em pacientes tratados com imunossupressão baseada em CSA

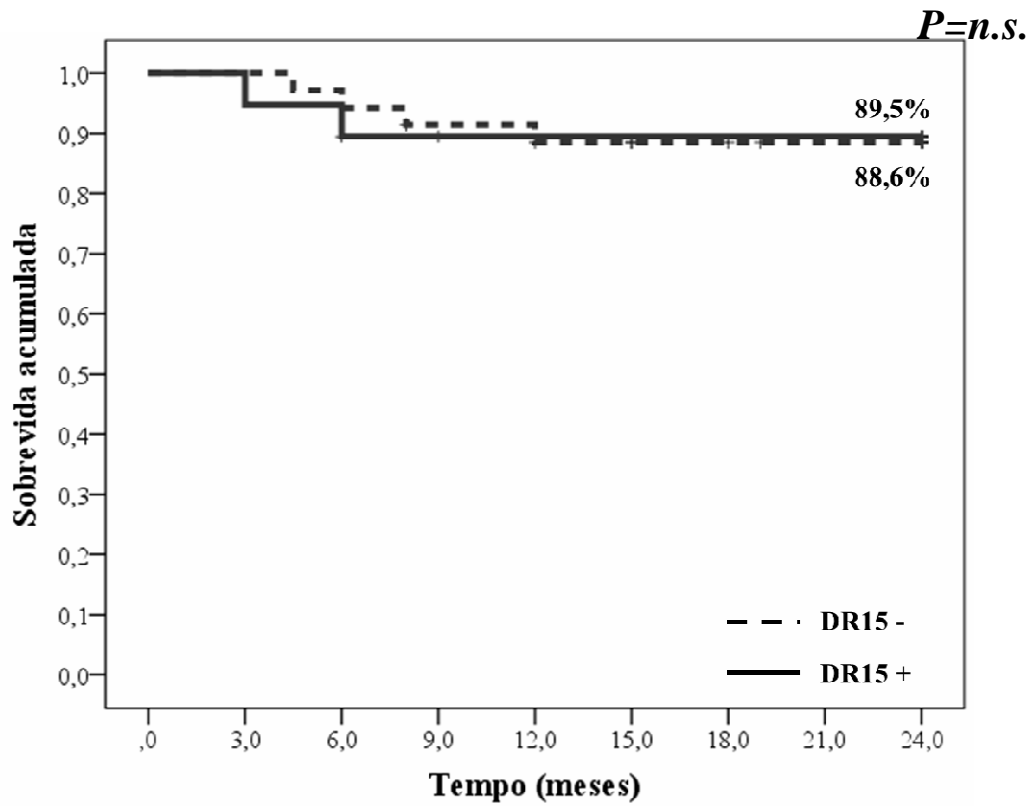


Figura 27. Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular tratados com CSA segundo o status HLA-DR15. Teste Log-Rank, $p = 0.975$.

Não houve diferença entre os grupos.

5.4.4.15. Curva de sobrevida global – (24meses): baseado na resposta aos 4,5 meses vs Não Resposta aos 4,5 meses apos o inicio do tratamento com imunossupressor baseado em CSA

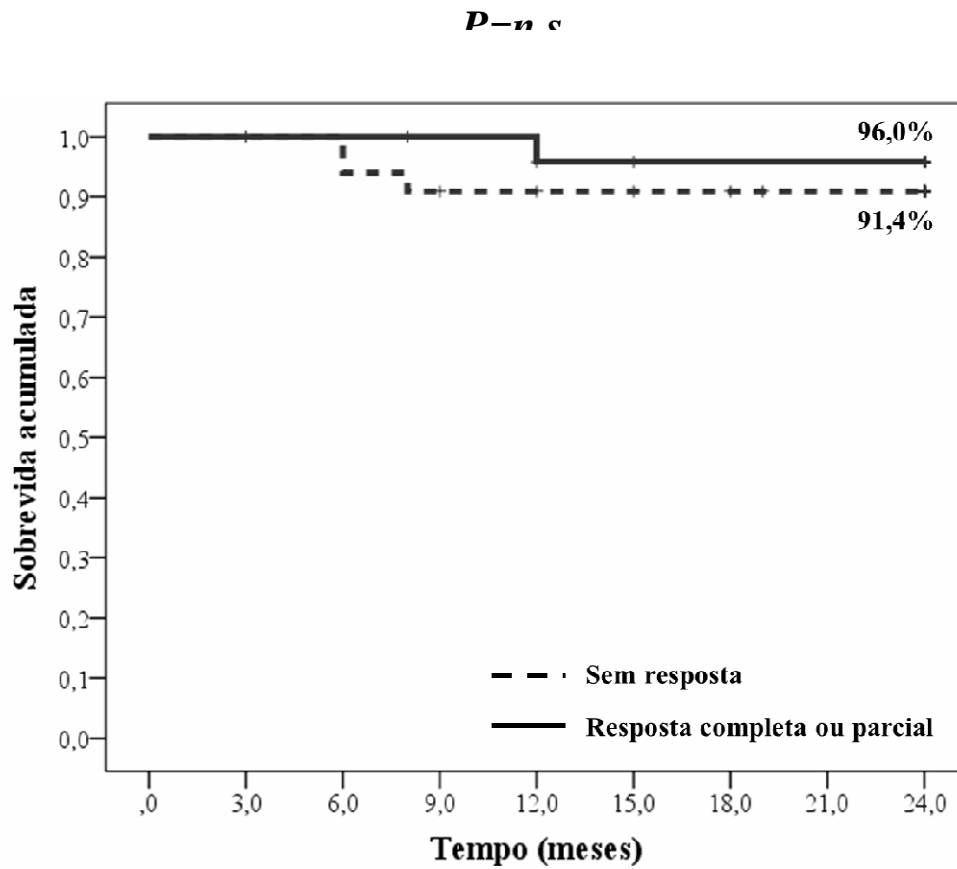


Figura 28. Curva de sobrevida em dois anos de pacientes com Aplasia Medular tratados com CSA segundo a resposta em 04 meses e meio. Teste Log-Rank, $p = 0.441$.

Não houve diferença entre os grupos quando se estratificou a partir da resposta aos imunossupressores aos 4,5 meses. A primeira resposta não mostrou influenciar o desfecho final.

Discussão

I)Análise Clínico-epidemiológico

O estudo mostrou que a população estudada, toda proveniente do estado da Bahia, apresenta um padrão de distribuição de faixa etária muito semelhante a dos casos de anemia aplasia descritos na literatura mundial. A mediana de idade foi de 23 anos, sendo a grande maioria dos casos, acometendo adulto-jovens, sendo mais de 80% dos casos abaixo de 50 anos de idade.

Observou-se uma tendência a um segundo pico de acometimento, na faixa etária de 55 anos, entretanto estatisticamente não ficou caracterizado como perda do equilíbrio da distribuição. Essa tendência a um segundo pico também é bem descrita internacionalmente, entretanto o que se supõe, é que nesta faixa etária haja um risco de superposição de casos de síndrome mielodisplásica hipocelular, que são confundidas com anemia aplasia idiopáticas.

Não era objetivo de o estudo buscar a incidência da rara doença em nosso estado. Não temos os registros de todos os casos da doença no estado. Certamente um número muito expressivo de doentes não são diagnosticados, e dos diagnosticados alguns podem não ter sido encaminhados para as duas únicas unidades de referência do estado. A vantagem de centralizar o atendimento e a dispensação do tratamento no estado da Bahia (somente em duas unidades Hupes/UFBA e HEMOBA), cria um razoável controle dos casos diagnosticados. Certamente melhora a assistência médica, farmacológica e os resultados clínicos, como Dra. Marsh (Marsh et al, 2010) enfatiza na diretriz de anemia aplásica europeu. Este guia é o mais utilizado no mundo todo. Observamos que a documentação de casos vem aumentando muito desde o início de nossos registros dos casos no início deste século.

Utilizando uma Regressão baseada num modelo exponencial, partindo do pressuposto de que o crescimento tenderia a atingir um platô, calculamos que com os dados registrados até o presente momento teríamos uma média de

1,2 casos de AA/Milhão Hab./Ano. Seguindo a previsão desta curva atingiríamos algo ao redor de 1,7 casos/mi/ano ao final deste século. Do ponto de vista estatístico esta projeção não tem validade, porque não temos como provar que a população se manterá estável, nem se a incidência não sofrera alterações. Entretanto, já nos orienta a dizer que no Estado da Bahia, ha uma incidência no mínimo igual à maioria dos países ocidentais, onde esta varia de 1 a 4 casos/mi/ano, diferentemente dos países asiáticos, onde esta é maior, e varia de 2-8 casos/mi/ano

II) Análise dos Biomarcadores

HLA

Baseado em achados muito interessantes que descrevem a importância de alguns HLA como HLA-DR15 na fisiopatologia da doença, fizemos uma vasta análise do sistema HLA e AA.

Um número muito grande de pacientes foram tipados antígenos do HLA de classe I, HLA-A,HLA-B, e de classe II, HLA-DR,HLA-DQ. Foi utilizado como grupo controle um número ainda maior (3680) de doadores saudáveis voluntários de medula óssea.

Foi encontrado como HLA de risco para desenvolvimento da doença 4 HLA: DR15,A25,B7,B40. Entretanto quando fizemos a correção de Bonferroni, que utiliza como p significativo para amostras genéticas(de grandes numero de variedades),e consideramos como clinicamente relevantes HLA que estivessem presentes em pelo menos 10% dos casos ou dos controles , somente o HLA-DR15 se mostrou fortemente de risco, clinica e estatisticamente. Apresenta-se em aproximadamente 42% dos casos de aplasia na Bahia (OR 2,2), numero muito significativo. Valor tão expressivo, que por estar presente em quase metade dos casos, utilizamos ate como método diagnóstico para casos duvidosos. Pacientes com pancitopenia onde o diagnostico de aplasia é possível, porém faltam elementos conclusivos, a presença do HLA-DR15 aumenta, em muito, a chance do caso se tratar de AA.

Foi encontrado como HLA protetor para o aparecimento para a AA os HLA: B15, B53, DR1, DR13, DR8. Também aplicando a correção de Bonferroni excluindo os casos onde o HLA não estivesse presente em pelo menos 10% dos casos ou dos controles, tivemos somente o HLA-B15 como fator protetor clinica e estatisticamente significativo. O mesmo estava presente somente em aproximadamente 5% dos casos de AA (com OR 0,2). A presença do HLAB15 praticamente exclui a possibilidade de um caso duvidoso se tratar de AA.

A partir destes achados preliminares, fizemos os mesmos cálculos para um segundo grupo comparativo de casos de anemia aplásica. O centro

colaborador do HC da UFPR nos enviou os dados retrospectivos de mais de 344 casos de anemia aplásica que tiveram realizado o seu HLA para classe I e II. Neste grupo (PARANA) fizemos as mesmas análises, e para nossa surpresa os mesmos resultados foram esperados. Somente o HLA DR15 e B15 tiveram relevância clínica e estatística na AA. Acreditávamos que por se tratarem de populações muito distintas etnicamente, os achados de HLA seriam extremamente divergentes. Por fim, os resultados do Paraná, fortaleceram ainda mais os achados do estado da Bahia

Baseado nos interessantes achados da associação do HLA DR15 e B15, levantamos a hipótese de haver algum grau de sinergismo entre os HLA. Os achados foram surpreendentes. Conseguimos documentar pela primeira vez na literatura a presença de sinergismo em uma doença onde o HLA tem papel fisiopatológico, como a anemia aplásica, de modo abrir um novo ramo de investigações em doenças imunomediadas associadas ao HLA, como as doenças HLA-B27.

O HLADR15+/B15- (40,5%) é muito maior ($p < 0,0001$) que o esperado em aplásicos do que no grupo controle, mostrando que o B15 perde seu efeito protetor na presença de DR15+.

Já o HLADR15-/B15+ (4%) encontra-se extremamente pouco frequente ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle, demonstrando que o B15+ se tornar ainda mais protetor quando em presença de DR15-.

Ninguém conseguiu explicar como o HLA interage com as doenças imunomediadas dependes de HLA específicos. Nem mesmo a espondilite anquilosante (EA), a doença mais exemplar desta associação, não conseguiu elucidar esta questão. Irmãos HLAB27 de pacientes com EA apresentam risco de 25% de apresentar a doença, mostrando que este fator exclusivamente não causaria a doença. Na população geral, indivíduos com B27+ tem baixíssimo risco de desenvolver a EA se não tiverem parentesco com ninguém com a doença. Talvez estudos de sinergismos de HLA pudessem auxiliar nesta compreensão fisiopatológica.

Em síntese, é a maior análise de associação de HLA e Anemia Aplásica já descrita na literatura mundial até o presente momento. Foi à primeira análise de HLA e AA, de larga escala na América do Sul, contribuindo muito para a

compreensão fisiopatológica desta rara e complexa doença, fatal se não tratada adequadamente.

Interessantemente, foi demonstrado, de maneira inédita que na faixa etária de 15-35 anos, a importância do HLA-DR15 na apresentação da doença parece ser mais forte. De maneira que talvez um novo braço de pesquisa seja aberto. Porque a doença se concentra nessa faixa etária ainda ninguém conseguiu explicar, mas nosso estudo conseguiu demonstrar que nesta faixa etária provavelmente o componente imunológico seja mais importante. Corroborando com este achado, também descrevemos pela primeira vez na literatura, a importância, por faixa etária, do HLA B15 na proteção do aparecimento da doença. Na mesma faixa etária de 15-35 anos, houve uma menor presença de HLA B15 nesta população, comprovando a importância do fator imunológico na doença, sobretudo nestas faixas etárias.

As idades extremas (infância e idoso), onde o HLA não se mostrou estatisticamente significativo no aparecimento da doença, nem na sua proteção, acreditamos que haja outros fatores mais decisivos, na fisiopatologia da doença. Na infância, talvez componentes genéticos, inatos, sejam os mais relevantes. Já, no idoso, o processo de envelhecimento da medula, redução dos telômeros, e maior predisposição a eventos apoptóticos do repertório de células estaminais, bem como transformação medular displásica, seja mecanismos mais significativos no desenvolvimento da anemia aplásica, nesta faixa etária.

POLIMORFISMO DE CITOCINAS

Na busca de novos biomarcadores associados com o diagnóstico da AA, e com o seu prognóstico, analisamos o polimorfismo do gene do interferon gamma. O IFN gamma é a mais associada das citocinas com a anemia aplásica. Os seus níveis séricos estão muito elevados na apresentação da doença, intra e extracelularmente. Muitos estudos demonstraram que há uma forte associação do polimorfismo do gene do IFNgamma na posição 874, com a AA. O fenótipo TT (substituição de T por A –“wild”-) está associado a maior suscetibilidade do gene a sua transcrição e tradução final do IFNgamma. Ou seja, o fenótipo TT seria teoricamente um hipersecretor natural de IFNgamma. Provavelmente o indivíduo com este fenótipo estaria mais susceptível a doenças imunomediadas por IFNgamma, e os indivíduos com fenótipo AA teriam menor resposta imunológica, ou até mesmo, maior susceptibilidade a infecções.

Contrariamente ao que se acreditava não encontramos nenhuma associação deste polimorfismo com os AA, nem mesmo tendência a tal fato. Na busca de um possível efeito sinérgico com o sistema HLA, testamos os achados dos resultados dos polimorfismos com o HLADR15 e B15, porém não foi demonstrada também, nenhuma associação.

Assim, em nossa coorte, este polimorfismo não foi importante na apresentação da AA. Estes achados corroboram o sabido fato de que a fisiopatologia da doença é extremamente complexa, multifatorial, e de que diferenças regionais genéticas e imunológicas devem coexistir.

III) Análise do Tratamento da Anemia Aplásica na Bahia

Fizemos uma subanálise de pacientes com os dados completos com relação ao tratamento. Totalizando 99 pacientes. O perfil clínico e epidemiológico deles seguiu ao da literatura: A grande maioria (80%) apresentavam-se abaixo de 45 anos, e sem causa aparente para o desenvolvimento da AA(70%); 30% dos casos era proveniente da capital (Salvador) e 56% dos casos foi composto por indivíduos do sexo masculino

Com relação à gravidade da doença ao diagnóstico 66% dos casos foi composto por formas de AA severas; 12,5% muito severas, e 21% não severas. O perfil hematimétrico mostrou: mediana de hemoglobina ao diagnóstico foi de 6,6g/dL, VCM de 95; de neutrófilos 600/mm; de plaquetas 15.000/mm, de linfócitos de 1600/mm. Perfil semelhante ao descrito com predomínio nas séries da forma severa e tendência a macrocitose.

Somente ¼ dos casos (24%) foi submetido ao TMO. Nosso estudo mostrou que aproximadamente 65% dos pacientes com AA não possui doador disponível compatível. O que explica em parte este número reduzido de pacientes transplantados. A maioria deles (70%) deles foi submetida ao tratamento baseado em ciclosporina A (somente dois desses em associação com timoglobulina). Os guidelines americanos e europeus recomendam o uso de tratamento imunossupressor baseado na associação de timoglobulina (ATG) com ciclosporina (CSA). A grande maioria dos estudos de fase III que comparou duas drogas versus monoterapia, o fez comparando sempre ATG versus ATG + CSA. Estes estudos mostraram superioridade do ATG+ CSA, porém não há descrição de comparação entre CSA versus CSA+ ATG. Se, por um lado, está claro que a CSA incrementa a resposta quando associado ao ATG, não sabemos se o ATG acrescenta alguma resposta à CSA. Carecemos de estudos relacionados, entretanto dada a raridade da doença e ATG+CSA ser considerado padrão-ouro, será muito difícil aparecimento desses estudos. Entretanto, nosso estudo pode mostrar em nível não comparativo que o uso da CSA monoterapia pode ser uma boa opção. Quando falamos em custo benefício e necessidade de leito de internação hematológico, talvez esta

possível “desvantagem” clínica da CSA monoterapia possa perder relevância. O medicamento é de acesso direto e imediato na rede SUS, e de baixo custo. O fármaco de alto custo ATG não é oferecido pela rede SUS, e não há disponibilidade de leito hematológico em realidade nacional, para internação imediata para a sua administração (o ATG deve ser ministrado em infusão contínua em acesso central, com leito de ocupação mínimo de 2 a 3 semanas). Assim, em suma, hoje nenhum serviço dos países, consegue iniciar esta terapia, o que estaria, supostamente, indo de encontro com a recomendação internacional. Outro ponto que merece destaque, é que todos os estudos que mostraram benefício da terapia combinada usaram ATG proveniente de cavalo. Não há, em nível mundial, oferta deste fármaco por questões do produtor. O ATG que se tem disponível é o de coelho. Em julho de 2011, Judith Marsh em representação da associação europeia de anemia aplásica (SAAWP- *Severe Aplastic Anemia Working Party*) publicou na BJH o relatório recomendando o não uso da tiroglobulina de coelho por resultados muito inferiores (50% da resposta com ATG de cavalo). Assim, ganha ainda mais força a prática que já é feita em nossa rede de saúde: uso do tratamento baseado em ciclosporina. Carece de estudos que suportem a eficácia deste tratamento, que não parece ser inferior aos propostos pela literatura.

Nosso estudo mostrou que não houve diferença de sobrevida global (SG) aos 2 anos (24 meses) e aos 5 anos (60 meses) quando se comparou tratamento com TMO alogênico e tratamento imunossupressor baseado em ciclosporina. Ambos atingiram aos 60 meses taxas de SG ao redor 70%, muito próximas as descritas pela literatura. Tais comparações não podem ser feitas pois seriam comparativas a séries históricas, entretendo suscitam a necessidade de estudos prospectivos comparativos.

O tratamento baseado em ciclosporina apresentou respostas muito satisfatórias e animadoras, gerando o questionamento: será que o tratamento imunossupressor baseado em ciclosporina não é a melhor opção para países em desenvolvimento? A facilidade de acesso ao medicamento, seu baixo custo, a falta de leitos disponíveis, a importância do tratamento precoce nesta doença, a ausência no mercado da ATG de cavalo, talvez justifiquem muito bem, o uso protocolar deste fármaco em primeira linha aos pacientes que não

serão submetidos ao Transplante de Medula Óssea Alogênico. Outro questionamento controverso a ser lançado seria se todos os pacientes não deveriam começar com o tratamento baseado em CSA, mesmo aqueles que viessem mais adiante a ser tratados com o TMO. Vimos em nossa população que maior parte dos pacientes (65%) não apresenta doador compatível, assim, na maioria das vezes estaríamos acertando em se iniciar precocemente a terapia imunossupressora. Outro ponto importante, é a dificuldade social da população e de logística da rede em se fazer a determinação de doador HLA compatível e de sua qualificação para a doação propriamente dita. Na prática, quando se encontra doador compatível (35% dos casos), tal fato demora semanas, justificando mais uma vez o início precoce da imunossupressão com ciclosporina em todos os casos, precocemente, ao diagnóstico.

Quando comparamos as taxas de SG aos 24 meses, em análise univariada, gênero (masculino ou feminino), proveniência (capital ou interior), presença de HLADR15 (positivo ou negativo), causalidade (idiopática ou não), não mostraram relação com as taxas de resposta.

Observando em separado o tratamento baseado em ciclosporina, fizemos a análise das taxas de SG aos 24 meses, baseado na resposta aos 4,5 meses. Devidos os pacientes, aos 4,5 meses, em respondedor (resposta parcial ou completa) versus não respondedor (ausência de qualquer resposta). Não houve diferença estatística entre os dois braços. A resposta inicial não pode servir de preditor de resposta futura.

As maiores diferenças foram observadas quando se analisou a gravidade da doença. Tanto pelos critérios de gravidade, como pelo número absoluto de neutrófilos ao diagnóstico (maior ou que 315, óbitos por curva ROC), as taxas de resposta de SG aos 24 meses, foram muito diferentes significativamente. Dos pacientes tratados, em qualquer modalidade, com doença muito severa ou com neutrófilos abaixo de 315/mm, apenas 40% atingiu os 24 meses. Por outro lado, ao redor de 90% daqueles com não severa ou severo (excluídos os muito severos) e neutrófilos acima de 315/mm, atingiram a SG aos 24 meses. Estes achados altamente significativos foram fortemente de encontro com a literatura que demonstra o número de neutrófilos ao diagnóstico como o mais importante fator prognóstico da doença.

Conclusões:

1-No estado da Bahia, a idade mediana de apresentação da anemia aplásica foi de 23 anos;

2-Houve predomínio de adultos jovens, com 80% dos casos diagnosticados abaixo de 45 anos;

3- Aproximadamente 30% dos casos de AA eram provenientes de Salvador;

4-A mediana de hemoglobina ao diagnóstico foi de 6,6 g/dL, VCM de 95; de neutrófilos 600/mm³; de plaquetas 15.000/mm³, de linfócitos de 1600/mm³;

5- A maioria dos casos (70%) dos casos de AA, era de origem idiopática;

6- A maioria dos casos era composta por homens (56%);

7- 2/3 dos casos (66%) era formado por casos de AA severos;

8-O HLA-DR15 está fortemente associado ao desenvolvimento da AA, presente em 42% dos casos;

9-O HLAB15 é fator protetor para o desenvolvimento da doença, presente somente em 6% dos casos;

10-Há uma importância geral do HLA DR15 e B15, no risco e na proteção respectivamente, nos pacientes com AA, entretanto, este impacto é mais evidente e mais significativo nas faixas etárias de 15 a 35 anos, mostrando que talvez o mecanismo imunomediado seja mais relevante nestas faixas etárias, enquanto talvez outros mecanismos sejam mais significativos nas idades extremas;

11-Descrito pela primeira vez na literatura interação de biomarcadores como HLA, no desenvolvimento da AA. Há um forte sinergismo entre os HLA: mostrando que o B15 perde parte de seu efeito protetor na presença de DR15+, e o B15+ se torna ainda mais protetor quando em presença de DR15-.

12-Não houve nenhum padrão de distribuição geo-espacial dos casos de AA no estado da Bahia. Foi considerada aleatória a distribuição dos casos no estado.

13-O tratamento mais utilizado (70%) em nosso serviço foi baseado em ciclosporina, sendo na grande maioria dos casos em monoterapia. Foi realizado Transplante Alogênico de Medula Óssea em 24% dos casos;

14-Aproximadamente 65% dos casos não apresentaram doadores compatíveis. Pela dificuldade de se encontrar doador, e pelo tempo que esta informação e preparo clínico demora, temos como prática recomendar o início precoce da ciclosporina;

15 - As curvas de sobrevida global aos 24 e aos 60 meses, comparando tratamento com TMO ou com CSA não mostrou diferença significativa. A taxa de SG aos 24 meses foi ao redor de 80% e de 70% aos cinco anos (60 meses) para ambos os grupos. Achados semelhantes às curvas da literatura internacional, mesmo com o uso de CSA em associação com ATG.

16-Houve diferença muito significativa entre casos de AA muito severos (40% de sobrevida global) versus não severo/severo (90%) na análise de Sobrevida Global aos 24 meses. As mesmas curvas foram observadas quando se comparou pacientes com neutrófilos acima ou abaixo de 315/mm ao diagnóstico.

17-Sexo (masculino/feminino), presença de HLADR15(positivo ou negativo), proveniência (capital ou interior) e causa da AA (idiopática ou secundária) não mostraram interferir na resposta de sobrevida global.

18- Os graus de resposta ao tratamento imunossupressor aos 4,5 meses, não foi capaz de prever a resposta global aos 24 meses.

19- O tratamento precoce em monoterapia da Ciclosporina A (CSA) é uma excelente opção terapêutica em primeira linha, em países em desenvolvimento.

FIM: todo final é um grande e novo começo....

7 REFERÊNCIAS

1. WU, Z., Z. QIN, AND J. WANG, ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN PDCD1 GENE AND APLASTIC ANEMIA IN CHINESE HAN POPULATION. *LEUK LYMPHOMA*. 2013 MAR 4.
2. EHRlich P. UEBER EINEM FALL VON ANÄMIE MIT BEMERKUNGEN ÜBER REGENERATIVE VERÄNDERUNGEN DES KNOCHENMARKS. *CHARITÉ-ANNALEN*. 1888;13: 300-309.
3. ISSARAGRISIL, S., ET AL., INCIDENCE OF APLASTIC ANEMIA IN BANGKOK. THE APLASTIC ANEMIA STUDY GROUP. *BLOOD*, 1991. **77**(10): P. 2166-8.
4. FONSECA, T. AND R. PAQUINI, ANEMIA APLÁSTICA SEVERA: ANÁLISE DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS PELO SERVIÇO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA NO PERÍODO DE 1979-1993. *REV. ASSOC. MED. BRAS.* , 2002. **48**(3).
5. BAUMELOU, E., M. GUIGUET, AND J.Y. MARY, EPIDEMIOLOGY OF APLASTIC ANEMIA IN FRANCE: A CASE-CONTROL STUDY. I. MEDICAL HISTORY AND MEDICATION USE. THE FRENCH COOPERATIVE GROUP FOR EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF APLASTIC ANEMIA. *BLOOD*, 1993. **81**(6): P. 1471-8.
6. ISSARAGRISIL, S., ET AL., AN ASSOCIATION OF APLASTIC ANAEMIA IN THAILAND WITH LOW SOCIOECONOMIC STATUS. APLASTIC ANEMIA STUDY GROUP. *BR J HAEMATOL*, 1995. **91**(1): P. 80-4.
7. SMITH, M.T., OVERVIEW OF BENZENE-INDUCED APLASTIC ANAEMIA. *EUR J HAEMATOL SUPPL*, 1996. **60**: P. 107-10.
8. YOUNG NS, ALTER BP. EPIDEMIOLOGY OF ACQUIRED APLASTIC ANEMIA. IN: YOUNG NS, ALTER BP. *APLASTIC ANEMIA: ACQUIRED*

AND INHERITED. PHILADELPHIA: WB SAUNDERS; 1994. P.24-31.

9. YOUNG, N., ET AL., *APLASTIC ANEMIA IN ORIENT. J HAEMATOL* 1986.
10. MALUF, E., ET AL., *INCIDENCE AND RISK FACTORS OF APLASTIC ANEMIA IN LATIN AMERICAN COUNTRIES: THE LATIN CASE-CONTROL STUDY. HAEMATOLOGICA*, 2009. **94**(9): P. 1220-6.
11. MALUF, E., *EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA PLÁSTICA SEVERA ADQUIRIDA-UM ESTUDO CASO-CONTROLE REALIZADO NO BRASIL. . 2000, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. P. 26.*
12. GORDON-SMITH, E. AND S. ISSARAGRISIL, *EPIDEMIOLOGY OF APLASTIC ANEMIA. CLIN HAEMATOL*, 1992. **5**(475-91).
13. *ROTHMAN KJ. MODERN EPIDEMIOLOGY. BOSTON: LITTLE, BROWN AND CO; 1986. P.514-7. .*
14. WANG, H. AND S. GRUFFERMAN, *APLASTIC ANEMIA AND OCCUPATIONAL PESTICIDE EXPOSURE: A CASE-CONTROL STUDY. J OCCUP MED* 1981. **23**(364-6).
15. ISSARAGRISIL, S., ET AL., *APLASTIC ANEMIA IN RURAL THAILAND: ITS ASSOCIATION WITH GRAIN FARMING AND AGRICULTURAL PESTICIDE EXPOSURE. APLASTIC ANEMIA STUDY GROUP. AM J PUBLIC HEALTH*, 1997. **87**(9): P. 1551-4.
16. LORAND, I.C., C.A. SOUZA, AND F.F. COSTA, *HAEMATOLOGICAL TOXICITY ASSOCIATED WITH AGRICULTURAL CHEMICALS IN BRAZIL. LANCET*, 1984. **1**(8373): P. 404.
17. FLEMING, L.E. AND W. TIMMENY, *APLASTIC ANEMIA AND PESTICIDES. AN ETIOLOGIC ASSOCIATION? J OCCUP MED*, 1993. **35**(11): P. 1106-16.

18. ROSS, D., *METABOLIC BASIS OF BENZENE TOXICITY*. EUR J HAEMATOL SUPPL, 1996. **60**: P. 111-8.
19. PASQUINI, R., *TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA NA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA: ESTUDO DE 108 CASOS*. 1991, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.
20. KELLY, J.P., D.W. KAUFMAN, AND S. SHAPIRO, *RISKS OF AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANEMIA IN RELATION TO THE USE OF CARDIOVASCULAR DRUGS: THE INTERNATIONAL AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANEMIA STUDY*. CLIN PHARMACOL THER, 1991. **49**(3): P. 330-41.
21. SHAPIRO, S., ET AL., *AGRANULOCYTOSIS IN BANGKOK, THAILAND: A PREDOMINANTLY DRUG-INDUCED DISEASE WITH AN UNUSUALLY LOW INCIDENCE*. APLASTIC ANEMIA STUDY GROUP. AM J TROP MED HYG, 1999. **60**(4): P. 573-7.
22. BROWN, K.E., ET AL., *HEPATITIS-ASSOCIATED APLASTIC ANEMIA*. N ENGL J MED, 1997. **336**(15): P. 1059-64.
23. ALTER, B., N. POTTER, AND F. LI, *CLASSIFICATION AND ETIOLOGY OF APLASTIC ANEMIA*. CLIN HAEMATOLOGY. **7**(1): P. 431-65.
24. LOCASCIULLI, A., ET AL., *TREATMENT OF SEVERE APLASTIC ANEMIA WITH ANTILYMPHOCYTE GLOBULIN, CYCLOSPORINE AND TWO DIFFERENT GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR REGIMENS: A GITMO PROSPECTIVE RANDOMIZED STUDY*. HAEMATOLOGICA, 2004. **89**(9): P. 1054-61.
25. MANNS, M. AND E. RAMBUSCH, *AUTOIMMUNITY AND EXTRAHEPATIC MANIFESTATIONS IN HEPATITIS C VIRUS INFECTION* J HEPATOL, 1999. **31**: P. 39-42.
26. ASTI, M., ET AL., *HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN CLASS II AND III ALLELES AND SEVERITY OF HEPATITIS C VIRUS-RELATED CHRONIC LIVER DISEASE*. HEPATOLOGY, 1999. **29**(4): P. 1272-9.

27. CAMITTA, B., E. THOMAS, AND D. NATHAN, *SEVERE APLASTIC ANEMIA: A PROSPECTIVE STUDY OF THE EFFECT OF EARLY BONE MARROW TRANSPLANTATION ON ACUTE MORTALITY*. BLOOD, 1976. **48**: P. 63-70.
28. CAMITTA, B., E. THOMAS, AND D. NATHAN, *A PROSPECTIVE STUDY OF ANDROGENS AND BONE MARROW TRANSPLANTATION FOR TREATMENT OF SEVERE APLASTIC ANEMIA*. BLOOD, 1979. **53**: P. 504-14.
29. MARSH, J.C., ET AL., *GUIDELINES FOR THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF APLASTIC ANAEMIA*. BR J HAEMATOL, 2009. **147**(1): P. 43-70.
30. YOUNG, N.S., *ACQUIRED APLASTIC ANEMIA*. ANN INTERN MED, 2002. **136**(7): P. 534-46.
31. MATHÉ, G. AND J. AMIEL, *BONE NARROW GRAFT IN MAN AFTER CONDITIONING BY ANTILYMPHOCYTIC SÉRUM*. . BMJ 1970. **2**: P. 131-36.
32. HINTERBERGER, W., ET AL., *RESULTS OF TRANSPLANTING BONE MARROW FROM GENETICALLY IDENTICAL TWINS INTO PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA*. ANN INTERN MED, 1997. **126**(2): P. 116-22.
33. CHAMPLIN, R. AND S. FEIG, *BONE NARROW TRANSPLANTATION FORM IDENTICAL TWINS IN THE TREATMENT OF APLASTIC ANAEMIA: IMPLICATION FOR THE PATHOGENESIS OF THE DISEASE*. BR J HAEMATOL 1984. **56**: P. 455-63.
34. YOUNG, N.S., R.T. CALADO, AND P. SCHEINBERG, *CURRENT CONCEPTS IN THE PATHOPHYSIOLOGY AND TREATMENT OF APLASTIC ANEMIA*. BLOOD, 2006. **108**(8): P. 2509-19.
35. AJLOUNI, K. AND T. DOEBLIN, *THE SYNDROME OF HEPATITS AND APLASTIC ANAEMIA*. BR J HAEMATOL 1974. **27**: P. 345.

36. HAGLER, L., ET AL., *APLASTIC ANEMIA FOLLOWING VIRAL HEPATITIS: REPORT OF TWO FATAL CASES AND LITERATURE REVIEW*. MEDICINE (BALTIMORE), 1975. **54**(2): P. 139-64.
37. POL, S., F. DRISS, AND A. DEVERGIE, *IS HEPATITIS C VÍRUS INVOLVED IN HEPATITIS-ASSOCIATED APLASTIC ANEMIA?* ANN INTERN MED, 1990. **113**: P. 435.
38. HIBBS, J.R., ET AL., *APLASTIC ANEMIA AND VIRAL HEPATITIS. NON-A, NON-B, NON-C?* JAMA, 1992. **267**(15): P. 2051-4.
39. YOUNG, N.S. AND D.W. KAUFMAN, *THE EPIDEMIOLOGY OF ACQUIRED APLASTIC ANEMIA*. HAEMATOLOGICA, 2008. **93**(4): P. 489-92.
40. SAFADI, R. AND Y. ILAN, *LACK OF KNOWN HEPATITIS VÍRUS IN HEPATITIS-ASSOCIATED APLASTIC ANEMIA AND OUTCOME AFTER BONE MARROW TRANSPLANTATION*. BONE MARROW TRANSPLANT 2001. **27**: P. 183.
41. MISHRA, B., ET AL., *HUMAN PARVOVIRUS B19 IN PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA*. AM J HEMATOL, 2005. **79**(2): P. 166-7.
42. YETGIN, S., ET AL., *PARVOVIRUS B19 INFECTION ASSOCIATED WITH SEVERE APLASTIC ANEMIA IN AN IMMUNOCOMPETENT PATIENT*. PEDIATR HEMATOL ONCOL, 2004. **21**(3): P. 223-6.
43. WONG, S., N. YOUNG, AND K. BROWN, *PREVALENCE OF PARVOVIRUS B19 IN LIVER TISSUE: NO ASSOCIATION WITH FULMINANT HEPATITIS OR HEPATITIS-ASSOCIATED APLASTIC ANEMIA*. J INFECT DIS 2003. **187**:: P. 1581.
44. LAZARUS, K.H. AND R.L. BAEHNER, *APLASTIC ANEMIA COMPLICATING INFECTIOUS MONONUCLEOSIS: A CASE REPORT AND REVIEW OF THE LITERATURE*. PEDIATRICS, 1981. **67**(6): P. 907-10.

45. BARANSKI, B., ET AL., *EPSTEIN-BARR VIRUS IN THE BONE MARROW OF PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA*. ANN INTERN MED, 1988. **109**(9): P. 695-704.
46. VINTERS, H., ET AL., *EVIDENCE FOR HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) INFECTION OF THE BRAIN IN A PATIENT WITH APLASTIC ANEMIA*. ACTA NEUROPATHOL 1988. **76**: P. 311.
47. SAMUEL, D., ET AL., *FATAL ACUTE HIV INFECTION WITH APLASTIC ANAEMIA, TRANSMITTED BY LIVER GRAFT*. LANCET, 1988. **1**(8596): P. 1221-2.
48. MORALES, C., I. SRIRAM, AND M. BAUMANN, *MYELODYSPLASTIC SYNDROME OCCURRING AS POSSIBLE FIRST MANIFESTATION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION WITH SUBSEQUENT PROGRESSION TO APLASTIC ANAEMIA*. INT J STD AIDS, 1990. **1**: P. 55.
49. ROSENFELD, C., W. RYBKA, AND D. WEINBAUM, *LATE GRAFT FAILURE DUE TO DUAL BONE MARROW INFECTION WITH VARIANTS A AND B OF HUMAN HERPEVIRUS-6*. EXP HEMATOL 1995. **23**: P. 626.
50. ROSENFELD, S.J. AND N.S. YOUNG, *VIRUSES AND BONE MARROW FAILURE*. BLOOD REV, 1991. **5**(2): P. 71-7.
51. KERNOHAN, E., *APLASTIC ANAEMIA COMPLICATING MILIARY TUBERCULOSIS*. BR MED J 1950. **12**: P. 399-400.
52. RUGMAN, F.P. AND R. COSSTICK, *APLASTIC ANAEMIA ASSOCIATED WITH ORGANOCHLORINE PESTICIDE: CASE REPORTS AND REVIEW OF EVIDENCE*. J CLIN PATHOL, 1990. **43**(2): P. 98-101.
53. SNYDER, R., *BENZENE AND LEUKEMIA*. CRIT REV TOXICOL, 2002. **32**(3): P. 155-210.

54. VALDEZ SALAS, B., E. GARCIA DURAN, AND M. WIENER, *IMPACT OF PESTICIDES USE ON HUMAN HEALTH IN MEXICO: A REVIEW*. REV ENVIRON HEALTH 200. **15**: P. 399.
55. MALUF, E.M., ET AL., *APLASTIC ANEMIA IN BRAZIL: INCIDENCE AND RISK FACTORS*. AM J HEMATOL, 2002. **71**(4): P. 268-74.
56. MUIR, K., C. CHILVERS, AND C. HARRISS, *THE ROLE OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL EXPOSURES IN THE AETIOLOGY OF ACQUIRED SEVERE APLASTIC ANAEMIA: A CASE CONTROL INVESTIGATION*. BR J HAEMATOL, 2003. **123**: P. 906.
57. AHAMED, M., ET AL., *CHILDHOOD APLASTIC ANAEMIA IN LUCKNOW, INDIA: INCIDENCE, ORGANOCHLORINES IN THE BLOOD AND REVIEW OF CASE REPORTS FOLLOWING EXPOSURE TO PESTICIDES* CLIN BIOCHEM 2006. **39**: P. 762.
58. MCCAHERN, E., ET AL., *THE IMPACT OF ASIAN DESCENT ON THE INCIDENCE OF ACQUIRED SEVERE APLASTIC ANAEMIA IN CHILDREN*. BR J HAEMATOL, 2003. **121**(1): P. 170-2.
59. PRAGER, D. AND C. PETERS, *DEVELOPMENT OF APLASTIC ANEMIA AND THE EXPOSURE TO STODDARD SOLVENT*. BLOOD, 1970. **35**(3): P. 286-7.
60. POWERS, D., *APLASTIC ANEMIA SECONDARY TO GLUE SNIFFING*. N ENGL J MED, 1965. **273**(13): P. 700-2.
61. KIRTADZE, I. AND D. ZURABASHVILI, *STUDY OF CHEMICAL COMPOSITION OF GLUE "RAZI" USED BY SOLVENT ABUSERS IN TBILISI*. GEORGIAN MED NEWS 2006. **133**: P. 65.
62. CRAWFORD, M., *APLASTIC ANAEMIA DUE TO TRINITROTOLUENE INTOXICATION*, BR MED J 1954. **2**: P. 430.

63. SABBIONI, G., ET AL., *COMPARISON OF BIOMARKERS IN WORKERS EXPOSED TO 2,4,6-TRINITROTOLUENE*. *BIOMARKERS*, 2007. **12**(1): P. 21-37.
64. SMICK, K., ET AL., *FATAL APLASTIC ANEMIA: AN EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF ITS RELATIONSHIP TO THE DRUG CHLORAMPHENICOL*. *J CHRONIC DIS* 17:899, 1964, 1964. **17**: P. 899.
65. MODAN, B., ET AL., *APLASTIC ANEMIA IN ISRAEL: EVALUATION OF THE ETIOLOGICAL ROLE OF CHLORAMPHENICOL ON A COMMUNITY-WIDE BASIS*. *AM J MED SCI* 1975. **270**: P. 441.
66. YUNIS, A.A., *CHLORAMPHENICOL TOXICITY: 25 YEARS OF RESEARCH*. *AM J MED*, 1989. **87**(3N): P. 44N-48N.
67. BEST, W.R., *DRUG-ASSOCIATED BLOOD DYSCRASIAS. RECENT ADDITIONS TO THE REGISTRY*. *JAMA*, 1963. **185**: P. 286-90.
68. LEVY, M., ET AL., *RISK OF AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANEMIA IN RELATION TO HISTORY OF INFECTIOUS MONONUCLEOSIS: A REPORT FROM THE INTERNATIONAL AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANEMIA STUDY*. *ANN HEMATOL*, 1993. **67**(4): P. 187-90.
69. KAUFMAN, D.W., ET AL., *DRUGS IN THE AETIOLOGY OF AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANAEMIA*. *EUR J HAEMATOL SUPPL*, 1996. **60**: P. 23-30.
70. RETSAGI, G., J. KELLY, AND D. KAUFMAN, *RISK OF AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANAEMIA IN RELATION TO USE OF ANTITHYROID DRUGS: INTERNATIONAL AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANAEMIA STUDY*. *BMJ*, 1988. **297**: P. 262.
71. *INTERNATIONAL AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANEMIA STUDY: ANTI-INFECTIVE DRUG USE IN RELATION TO THE RISK OF*

- AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANEMIA*. ARCH INTERN MED. **149**: P. 1036.
72. BITHELL, T.C. AND M.M. WINTROBE, *DRUG-INDUCED APLASTIC ANEMIA*. SEMIN HEMATOL, 1967. **4**(3): P. 194-221.
73. WILLIAMS, D.M., R.E. LYNCH, AND G.E. CARTWRIGHT, *DRUG-INDUCED APLASTIC ANEMIA*. SEMIN HEMATOL, 1973. **10**(3): P. 195-223.
74. NISSEN, C., ET AL., *SPECK B. PERIPHERAL BLOOD CELLS FROM PATIENTS WITH APLASTIC ANAEMIA IN PARTIAL REMISSION SUPPRESS GROWTH OF THEIR OWN BONE MARROW PRECURSORS IN CULTURE*. BR J HAEMATOL, 1980. **45**: P. 233-43.
75. HOFFMAN R, Z.E., LUTTON JD, ZALUSKY R, WASSERMAN LR, *SUPPRESSION OF ERYTHROID-COLONY FORMATION BY LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA*. N ENGL J MED 1977. **296**: P. 10-13.
76. NAKAO, S., A. TAKAMI, AND H. TAKAMATSU, *ISOLATION OF A T-CELL CLONE SHOWING HLA-DRBI*0405-RESTRICTED CYTOTOXICITY FOR HEMATOPOIETIC CELLS IN A PATIENT WITH APLASTIC ANEMIA*. BLOOD, 1997. **89**: P. 3691-99.
77. ZENG, W., ET AL., *LIMITED HETEROGENEITY OF T CELL RECEPTOR BV USAGE IN APLASTIC ANEMIA*. J CLIN INVEST, 2001. **108**(5): P. 765-73.
78. NAKAO, S., ET AL., *INTERFERON-GAMMA GENE EXPRESSION IN UNSTIMULATED BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS PREDICTS A GOOD RESPONSE TO CYCLOSPORINE THERAPY IN APLASTIC ANEMIA*. BLOOD, 1992. **79**(10): P. 2532-5.
79. NISTICO, A. AND N.S. YOUNG, *GAMMA-INTERFERON GENE EXPRESSION IN THE BONE MARROW OF PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA*. ANN INTERN MED, 1994. **120**(6): P. 463-9.

80. MELENHORST, J., ET AL., *T CELLS SELECTIVELY INFILTRATE BONE MARROW AREAS WITH RESIDUAL HAEMOPOIESIS OF PATIENTS WITH ACQUIRED APLASTIC ANAEMIA*. BR J HAEMATOL 1997. **99**: P. 517-19.
81. MACIEJEWSKI, J.P., ET AL., *BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE PHENOTYPE IN PATIENTS WITH BONE MARROW FAILURE*. EXP HEMATOL, 1994. **22**(11): P. 1102-10.
82. ZOUMBOS, N.C., ET AL., *CIRCULATING ACTIVATED SUPPRESSOR T LYMPHOCYTES IN APLASTIC ANEMIA*. N ENGL J MED, 1985. **312**(5): P. 257-65.
83. HIRANO, N., ET AL., *AUTOANTIBODIES FREQUENTLY DETECTED IN PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA*. BLOOD, 2003. **102**(13): P. 4567-75.
84. ZENG, W., ET AL., *CHARACTERIZATION OF T-CELL REPERTOIRE OF THE BONE MARROW IN IMMUNE-MEDIATED APLASTIC ANEMIA: EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF ANTIGEN-DRIVEN T-CELL RESPONSE IN CYCLOSPORINE-DEPENDENT APLASTIC ANEMIA*. BLOOD, 1999. **93**(9): P. 3008-16.
85. MELENHORST, J.J., ET AL., *ANALYSIS OF T-CELL CLONALITY IN BONE MARROW OF PATIENTS WITH ACQUIRED APLASTIC ANAEMIA*. BR J HAEMATOL, 1997. **96**(1): P. 85-91.
86. GALE, R.P., ET AL., *APLASTIC ANEMIA: BIOLOGY AND TREATMENT*. ANN INTERN MED, 1981. **95**(4): P. 477-94.
87. CAMITTA, B., R. STORB, AND E. THOMAS, *APLASTIC ANEMIA (PART 2): PATHOGENESIS, DIAGNOSIS, TREATMENT, AND PROGNOSIS*. N ENGL J MED 1982. **306**: P. 712-18.
88. MACIEJEWSKI, J.P., ET AL., *INCREASED EXPRESSION OF FAS ANTIGEN ON BONE MARROW CD34+ CELLS OF PATIENTS WITH APLASTIC ANAEMIA*. BR J HAEMATOL, 1995. **91**(1): P. 245-52.

89. MAVROUDI, I. AND H.A. PAPADAKI, *GENETIC ASSOCIATIONS IN ACQUIRED IMMUNE-MEDIATED BONE MARROW FAILURE SYNDROMES: INSIGHTS IN APLASTIC ANEMIA AND CHRONIC IDIOPATHIC NEUTROPENIA*. CLIN DEV IMMUNOL, 2012. **2012**: P. 123789.
90. RISITANO, A., ET AL., *OLIGOCLONAL AND POLYCLONAL CD4 AND CD8 LYMPHOCYTES IN APLASTIC ANEMIA AND PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA MEASURED BY VB CDR3 SPECTRATYPING AND FLOW CYTOMETRY*. BLOOD, 2002. **100**(1): P. 178-183.
91. VAN DER LINDEN, S., H. VALKENBURG, AND A. CATS, *THE RISK OF DEVELOPING ANKYLOSING SPONDYLITIS IN HLA-B27 POSITIVE INDIVIDUALS: A FAMILY AND POPULATION STUDY*. BR J RHEUMATOL, 1983. **22**(4 SUPPL 2): P. 18-9.
92. SHAO, W., ET AL., *APLASTIC ANEMIA IS ASSOCIATED WITH HLA-DRB1*1501 IN NORTHERN HAN CHINESE*. BRITISH JOURNAL OF HEMATOLOGY, 2000. **71**(4): P. 350-352.
93. NAKAO, S., H. TAKAMATSU, AND T.E.A. CHUHJO, *IDENTIFICATION OF A SPECIFIC HLA CLASS II HAPLOTYPE STRONGLY ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY TO CYCLOSPORINE-DEPENDENT APLASTIC ANEMIA*. BLOOD. 1994;**84**(12):4257-4261. . BLOOD, 1994. **84**(12): P. 4257-4261.
94. USMAN, M., ET AL., *INCREASED EXPRESSION OF HLA DR2 IN ACQUIRED APLASTIC ANEMIA AND ITS IMPACT ON RESPONSE TO IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY*. J PAK MED ASSOC, 2004. **54**(5): P. 251-4.
95. REHMAN, S., ET AL., *THE FREQUENCY OF HLA CLASS I AND II ALLELES IN PAKISTANI PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA*. IMMUNOL INVEST, 2009. **38**(8): P. 812-9.

96. FERNÁNDEZ-TORRES, J., ET AL., *THE ANCESTRY OF THE HLA-DRB1 15 ALLELE PREDISPOSES THE MEXICAN MESTIZO TO THE DEVELOPMENT OF APLASTIC ANEMIA*. *HUMAN IMMUNOLOGY*, 2012. **73**(8): P. 840-845.
97. FIORILLO, M.T. AND R. SORRENTINO, *T-CELL RESPONSES AGAINST VIRAL AND SELF-EPITOPES AND HLA-B27 SUBTYPES DIFFERENTIALLY ASSOCIATED WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS*. *ADV EXP MED BIOL*, 2009. **649**: P. 255-62.
98. KATAGIRI, T., ET AL., *FREQUENT LOSS OF HLA ALLELES ASSOCIATED WITH COPY NUMBER-NEUTRAL 6PLOH IN ACQUIRED APLASTIC ANEMIA*. *BLOOD*, 2011. **118**(25): P. 6601-9.
99. MÄRKER-HERMANN, E., ET AL., *HLA-B27-DERIVED PEPTIDES AS AUTOANTIGENS FOR T LYMPHOCYTES IN ANKYLOSING SPONDYLITIS*. *ARTHRITIS RHEUM.*, 1997. **40**(11): P. 2047-54.
100. CHEN, B., D. LI, AND W. XU, *ASSOCIATION OF ANKYLOSING SPONDYLITIS WITH HLA-B27 AND ERAP1: PATHOGENIC ROLE OF ANTIGENIC PEPTIDE*. *MED HYPOTHESES*, 2013. **80**(1): P. 36-8.
101. SHEEHAM, N., *HLA-B27: WHAT'S NEW?*. *RHEUMAT*, 2010. **49**: P. 621-621.
102. VAN SCHAİK, S.M. AND A.K. ABBAS, *ROLE OF T CELLS IN A MURINE MODEL OF ESCHERICHIA COLI SEPSIS*. *EUR J IMMUNOL*, 2007. **37**(11): P. 3101-10.
103. BARON, J.L., ET AL., *ACTIVATION OF A NONCLASSICAL NKT CELL SUBSET IN A TRANSGENIC MOUSE MODEL OF HEPATITIS B VIRUS INFECTION*. *IMMUNITY*, 2002. **16**(4): P. 583-94.
104. SCHOENBORN, J.R. AND C.B. WILSON, *REGULATION OF INTERFERON-GAMMA DURING INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES*. *ADV IMMUNOL*, 2007. **96**: P. 41-101.

105. LIU, M., ET AL., *ASSOCIATION OF INTERFERON-GAMMA GENE HAPLOTYPE IN THE CHINESE POPULATION WITH HEPATITIS B VIRUS INFECTION*. IMMUNOGENETICS, 2006. **58**(11): P. 859-64.
106. PARKER, C., ET AL., *DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA*. BLOOD, 2005. **106**(12): P. 3699-709.
107. ARATEN, D.J., ET AL., *CLONAL POPULATIONS OF HEMATOPOIETIC CELLS WITH PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA GENOTYPE AND PHENOTYPE ARE PRESENT IN NORMAL INDIVIDUALS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1999. **96**(9): P. 5209-14.
108. NAKAKUMA, H. AND T. KAWAGUCHI, *PATHOGENESIS OF SELECTIVE EXPANSION OF PNH CLONES*. INT J HEMATOL, 2003. **77**(2): P. 121-4.
109. LYAKISHEVA, A., ET AL., *PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF EGR-1 AND TAXREB107*. EXP HEMATOL, 2002. **30**(1): P. 18-25.
110. HEENEY, M.M., ET AL., *INCREASED EXPRESSION OF ANTI-APOPTOSIS GENES IN PERIPHERAL BLOOD CELLS FROM PATIENTS WITH PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA*. MOL GENET METAB, 2003. **78**(4): P. 291-4.
111. BACIGALUPO, A., ET AL., *ANTILYMPHOCYTE GLOBULIN, CYCLOSPORIN, AND GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR IN PATIENTS WITH ACQUIRED SEVERE APLASTIC ANEMIA (SAA): A PILOT STUDY OF THE EBMT SAA WORKING PARTY*. BLOOD, 1995. **85**(5): P. 1348-53.
112. MARSH, J., ET AL., *PROSPECTIVE RANDOMIZED MULTICENTER STUDY COMPARING CYCLOSPORIN ALONE VERSUS THE COMBINATION OF ANTITHYMOCYTE GLOBULIN AND CYCLOSPORIN FOR TREATMENT OF PATIENTS WITH NONSEVERE*

- APLASTIC ANEMIA: A REPORT FROM THE EUROPEAN BLOOD AND MARROW TRANSPLANT (EBMT) SEVERE APLASTIC ANAEMIA WORKING PARTY. BLOOD, 1999. 93(7): P. 2191-5.*
113. GLUCKMAN, E., ET AL., *MULTICENTER RANDOMIZED STUDY COMPARING CYCLOSPORINE-A ALONE AND ANTITHYMOCYTE GLOBULIN WITH PREDNISONE FOR TREATMENT OF SEVERE APLASTIC ANEMIA. BLOOD, 1992. 79(10): P. 2540-6.*
114. HEMOTERAPIA, S.B.D.H.E., *ANEMIA APLÁSTICA GRAVE: TRATAMENTO. 2008.*
115. NAJEAN, Y. AND O. HAGUENAUER, *LONG-TERM (5 TO 20 YEARS) EVOLUTION OF NONGRAFTED APLASTIC ANEMIAS. THE COOPERATIVE GROUP FOR THE STUDY OF APLASTIC AND REFRACTORY ANEMIAS. BLOOD, 1990. 76(11): P. 2222-8.*
116. HALPERIN, D.S., ET AL., *SEVERE ACQUIRED APLASTIC ANEMIA IN CHILDREN: 11-YEAR EXPERIENCE WITH BONE MARROW TRANSPLANTATION AND IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY. AM J PEDIATR HEMATOL ONCOL, 1989. 11(3): P. 304-9.*
117. MARSH, J.C., ET AL., *GUIDELINES FOR THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF ACQUIRED APLASTIC ANAEMIA. BR J HAEMATOL, 2003. 123(5): P. 782-801.*
118. YOUNG, N.S. AND A.J. BARRETT, *THE TREATMENT OF SEVERE ACQUIRED APLASTIC ANEMIA. BLOOD, 1995. 85(12): P. 3367-77.*
119. BACIGALUPO, A., ET AL., *TREATMENT OF APLASTIC ANAEMIA (AA) WITH ANTILYMPHOCYTE GLOBULIN (ALG) AND METHYLPREDNISOLONE (MPRED) WITH OR WITHOUT ANDROGENS: A RANDOMIZED TRIAL FROM THE EBMT SAA WORKING PARTY. BR J HAEMATOL, 1993. 83(1): P. 145-51.*
120. BITENCOURT, M., *O TRATAMENTO DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA ADQUIRIDA COM A COMBINAÇÃO DE CICLOSPORINA E*

PREDNISONA. ANÁLISE DE 117 PACIENTES. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, MEDICINA INTERNA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. 1998. .

121. AL-GHAZALY, J., ET AL., *CYCLOSPORINE MONOTHERAPY FOR SEVERE APLASTIC ANEMIA: A DEVELOPING COUNTRY EXPERIENCE. ANN SAUDI MED, 2005. 25(5): P. 375-9.*
122. MASCHAN, A., ET AL., *RESULTS AT A SINGLE CENTRE OF IMMUNOSUPPRESSION WITH CYCLOSPORINE A IN 66 CHILDREN WITH APLASTIC ANAEMIA. BR J HAEMATOL, 1999. 106(4): P. 967-70.*
123. SCHREZENMEIER, H., P. MARIN, AND A. RAGHAVACHAR, *RELAPSE OF APLASTIC ANEMIA AFTER IMMUNOSUPPRESSIVE TREATMENT: A REPORT FROM THE EUROPEAN BONE MARROW TRANSPLANTATION GROUP SAA WORKING PARTY. . BR J HEMATOL, 1993. 85: P. 371-377.*
124. FUHRER, M., ET AL., *HLA ASSOCIATION IS DIFFERENT IN CHILDREN AND ADULTS WITH SEVERE ACQUIRED APLASTIC ANEMIA. PEDIATR BLOOD CANCER., 2007. 48(2): P. 186-91.*
125. FENG, X., ET AL., *CYTOKINE SIGNATURE PROFILES IN ACQUIRED APLASTIC ANEMIA AND MYELODYSPLASTIC SYNDROMES. HAEMATOLOGICA, 2011. 96(4): P. 602-6.*
126. YOUNG, N.S. AND J. MACIEJEWSKI, *THE PATHOPHYSIOLOGY OF ACQUIRED APLASTIC ANEMIA. N ENGL J MED, 1997. 336(19): P. 1365-72.*
127. TAMAI, H. AND S. KIMURA, *ASSOCIATION BETWEEN DRB1*08032 HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN AND METHIMAZOLE-INDUCED AGRANULOCYTOSIS IN JAPANESE PATIENTS WITH GRAVES DISEASE. ANN INTERN MED, 1996. 124: P. 490-494.*

128. ALBERT, E., ET AL., *HLA ANTIGENS AND HAPLOTYPES IN 200 PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA*. TRANSPLANTATION, 1976. **22**(5): P. 528-31.
129. KAPUSTIN, S., ET AL., *HLA-DR-ALA74 BETA IS ASSOCIATED WITH RISK AND POOR OUTCOME OF SEVERE APLASTIC ANEMIA*. . ANN HEMATOL, 2001. **80**: P. 60-71.
130. JIN, J.Y., ET AL., *IMMUNE SUPPRESSION THERAPY IN APLASTIC ANEMIA: INFLUENCING FACTORS ON RESPONSE AND SURVIVAL*. KOREAN J INTERN MED, 1995. **10**(1): P. 25-31.
131. VIOLLIER, R. AND A. TICHELLI, *PREDICTIVE FACTORS FOR CURE AFTER IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY OF APLASTIC ANEMIA*. ACTA HAEMATOL, 2000. **103**(1): P. 55-62.
132. YAMAZAKI, H., ET AL., *CYCLOSPORINE THERAPY FOR ACQUIRED APLASTIC ANEMIA: PREDICTIVE FACTORS FOR THE RESPONSE AND LONG-TERM PROGNOSIS*. INT J HEMATOL, 2007. **85**(3): P. 186-90.
133. MANLY, B. F. J. Randomization, Bootstrap and Monte Carlo

Methods in Biology, Flórida: Chapman & Hall, 2006. 460p.
134. MANTEL, B. F. J. The detection of disease clustering and a generalised

regression approach. Cancer Research, Philadelphia, v. 27, p. 209-220.

1967.
135. VIOLA, D. N. Detecção e modelagem de padrão espacial em dados

binários e de contagem. Tese de Doutorado em Estatística e

Experimentação Agronômica. USP.

APÊNDICES I - FICHA DE COLETA DE DADOS

A ficha de coleta de dados foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética

IDENTIFICAÇÃO

Nome (Sigla) : _____

Prontuário: _____

Classe social: _____

Profissão: _____

Idade: _____ Sexo.: ____ masc ____ fem

Raça: ____ caucasiano/ ____ afrodescendente/ ____ pardo/ ____ amarelo

DIAGNÓSTICO

Data diagnóstico: _____

Hemograma do diagnóstico: Hb _____ / Leuco _____ / neutrof _____ / plaq. _____

Diagnóstico:

____ Anemia Aplásica muito Grave (neutr.<500/mm)

____ Anemia Aplásica Grave (plaq <20.000; neutro 200-500/mm; Hb transfusional)

____ Anemia Aplásica Moderada (plaq > 20.000; neutrofilos > 500/mm; hb não transfusional)

HLA: _____

HLA DR15: sim: ____ não: ____

BMO: _____

Citogenética/Fish: ____ normal ____ alterada: _____

Alterações exames laboratoriais: não ____ sim: ____

Alteração painel infectológico: não ____ sim: ____

Aplasia idiopática: sim ____ não ____

Causa suspeita: _____

Causa identificada: _____

Outros achados significativos _____

TRATAMENTO

Tratamento proposto: _____

Tempo entre diagnóstico e tratamento: ____ semanas

Histórico transfusional entre diagnóstico e tratamento (em número): _____ CHF
_____ CH
_____ CPF aférese
_____ CP aférese
_____ CPF pool (unidades)

RESPOSTA AO TRATAMENTO

CRITÉRIOS:

- resposta completa: Hb normalizado, neutrof.>1000/mm, plaq.>100.00/mm);
- resposta parcial: melhora das séries, sendo neutrof.>500-sem infecções e suporte transfusional;
- resposta mínima: neutrof.>500/mm, porém dependência transfusional-Marsh J

3 meses do diagnóstico:

resposta: ____ resposta completa
____ resposta parcial
____ resposta mínima
____ outros: _____
____ óbito.- causa: _____

tratamento proposto: ____ o mesmo em andamento
____ outro _____

6 meses do diagnóstico:

resposta: ____ resposta completa
____ resposta parcial
____ resposta mínima
____ outros: _____
____ óbito.- causa: _____

tratamento proposto: ____ o mesmo em andamento
____ outro _____

12 meses do diagnóstico:

resposta: ____ resposta completa
____ resposta parcial
____ resposta mínima
____ outros: _____
____ óbito.- causa: _____

tratamento proposto: ____ o mesmo em andamento
____ outro _____

18 meses do diagnóstico:

resposta: ____ resposta completa
____ resposta parcial
____ resposta mínima
____ outros: _____
____ óbito.- causa: _____

tratamento proposto: ____ o mesmo em andamento

___ outro _____

24 meses do diagnóstico:

resposta: ___ resposta completa

___ resposta parcial

___ resposta mínima

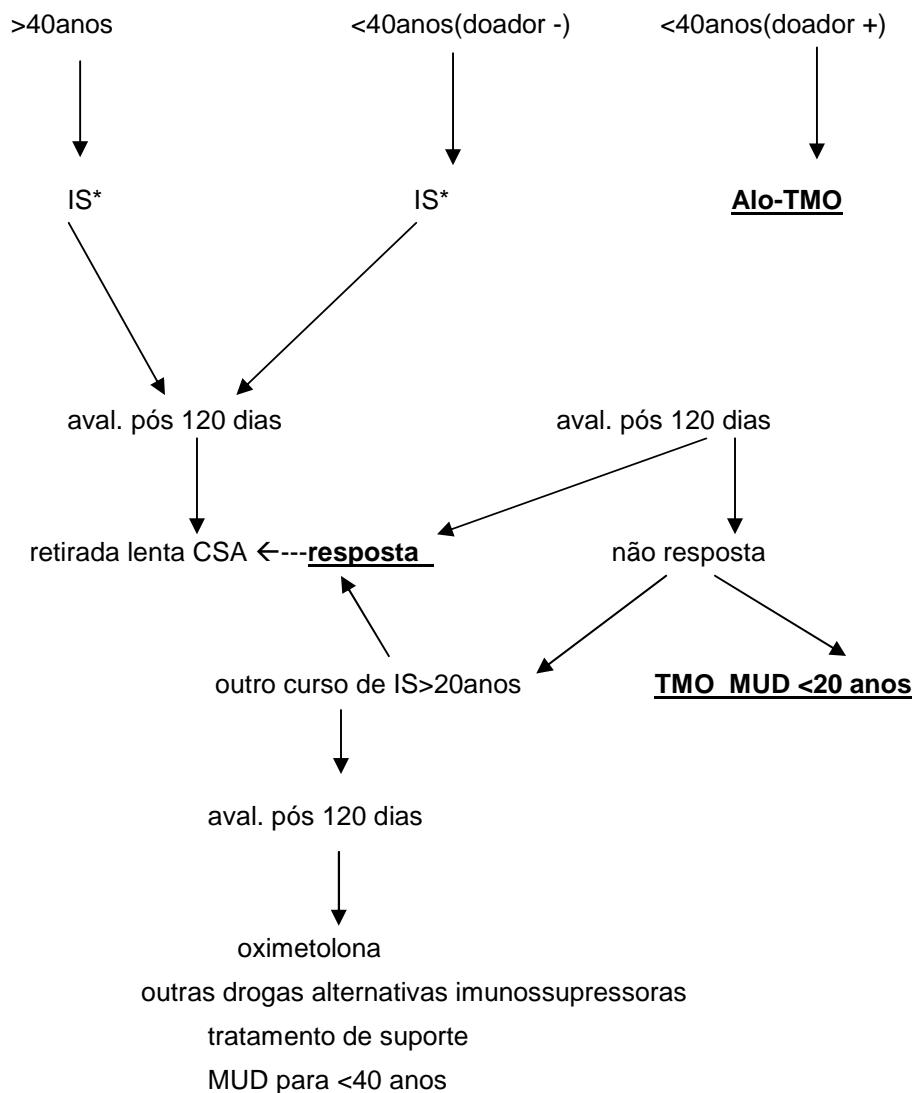
___ outros: _____

___ óbito.- causa: _____

tratamento proposto: ___ o mesmo em andamento

___ outro _____

APÊNDICE II - FLUXOGRAMA DE DECISÃO DE TRATAMENTO DA AAA



*IS (imunossupressão): ciclosporina 5-7mg/kg VO dia divididos em duas tomadas, acompanhando dosagem sérica de ciclosporinemia (range/;150-250ul/ml), por pelo menos 1 ano.

ou

globulina antilinfocítica de cavalo (1,5mg/kd ev dia / 5 dias) + ciclosporina VO +- 8mg/kg/dia divididos em duas tomadas, acompanhando dosagem sérica, por pelo menos 6 meses.

ou

globulina antitimocítica de coelho (3,75mg/kg / ev 5 dias) + ciclosporina VO +- 8mg/kg/dia divididos em duas tomadas, acompanhando dosagem sérica, por pelo menos 6 meses.

APÊNDICE III – PROTOCOLO DE TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR DA AAA

Terapia imunossupressora

Nesta opção as terapias mais aceitas e utilizadas na prática médica são:

- a) Terapia imunossupressora monoterápica (ciclosporina VO);
- b) Terapia imunossupressora com duas drogas (Ciclosporina-CSA e Prednisona-Pdn);
- c) Terapia imunossupressora com três drogas (CSA, metilprednisolona e Globulina Antilinfocítica/Antitimocítica).

Existem, entretanto diversas opções de drogas com provável atividade sobre a AAG, entretanto com escassa disponibilidade de protocolos bem definidos. No Brasil, os três esquemas são aceitos e utilizados difusamente, a depender do acesso às drogas, e de suas disponibilidades em cada centro de tratamento da AAS.

a- Terapia imunossupressora com monoterapia (Ciclosporina)

Critérios de inclusão:

- anemia aplásica severa;
- pacientes excluídos do Transplante Alogênico;
- ausência de sepsis ou infecção grave (fúngica, bacteriana disseminada, etc.);
- recidiva pós TMO ou outros tratamentos;
- AST/ALT até 2 vezes o limite superior da normalidade;
- Beta HCG negativos;

-HIV negativo;

-DEB teste negativo.

Esquema terapêutico:

CSA: d1 a 1 ano- 8mg/kg/dia VO fracionada em duas doses. Após 1 ano reduzir a dose em 10% ao mês.

Observações:

1-monitoramento de toxicidade: dosar no mínimo mensalmente a ciclosporinemia, uremia, creatinina, sódio, potássio, cálcio, magnésio, hemograma e reticulócitos (de acordo com as intercorrências ou dosagem próximas aos do limite da normalidade aumentar a frequência). Dosar bimestralmente, ou de acordo com as necessidades: função hepática completa, painel de hemólise.

2-se creatinina até 1,4 manter a dose. Se a creatinina entre 1,4 e 1,8 reduzir a dose em 50%. Se a creatinina >1,8 suspender a medicação (Estas doses podem variar de acordo com o nível de ciclosporinemia).

3-ciclosporinemia: dever-se-á manter os níveis de ciclosporinemia ao redor de 400ng/mL (contanto que tais valores não sejam tóxicos para o paciente).

b-Terapia imunossupressora com duas drogas (Ciclosporina e Prednisona)

Critérios de inclusão:

-anemia aplásica severa;

-pacientes excluídos do Transplante Alogênico;

-ausência de sepsis ou infecção grave (fúngica, bacteriana disseminada, etc.);

-recidiva pós TMO ou outros tratamentos;

-AST/ALT até 2 vezes o limite superior da normalidade;

-Beta HCG negativos;

-HIV negativo;

-DEB teste negativo.

Esquema terapêutico (CSA+PDN):

CSA: d1 a 1 ano- 8mg/kg/dia VO fracionada em duas doses. Após 1 ano reduzir a dose em 5% ao mês .

PDN: 1mg/kg/dia VO de d1 a d 45 (fazendo redução gradual da dose ao final do período).

Observações:

1-monitorar: dosar-se-á no mínimo mensalmente a ciclosporinemia, uremia, creatinina, sódio, potássio, cálcio, magnésio, hemograma e reticulócitos (de acordo com as intercorrências ou dosagem próximas aos do limite da normalidade aumentar a frequência). Dosar bimestralmente, ou de acordo com as necessidades: função hepática completa, painel de hemólise.

2-se creatinina até 1,4 manter a dose. Se a creatinina entre 1,4 e 1,8 reduzir a dose em 50%. Se a creatinina >1,8 suspender a medicação (Estas doses podem variar de acordo com o nível de ciclosporinemia).

3-ciclosporinemia: dever-se-á manter os níveis de ciclosporinemia ao redor de 400ng/mL (contanto que tais valores não sejam tóxicos para o paciente).

c-Terapia imunossupressora com três drogas (Ciclosporina, metilprednisolona e Globulina Antilinfocítica/Antitimocítica)

Critérios de inclusão:

-anemia aplásica severa;

- pacientes excluídos do Transplante Alogênico;
- ausência de sepsis ou infecção grave (fungica , bacteriana disseminada, etc);
- recidiva pós TMO ou outros tratamentos;
- AST/ALT até 2 vezes o limite superior da normalidade;
- Beta HCG negativos;
- HIV negativo;
- DEB teste negativo.

Esquema terapêutico - Terapia combinada de ATG/ALG e ciclosporina (CSA):

- Globulina antilinfocitária (Lymphoglobuline – Horse ALG – Pasteur Merieux) na apresentação de 100mg em frasco de 5ml e posologia de 15mg/kg/dia, EV, 1x/dia por 5 dias, 8 a 12 horas de infusão por acesso venoso central ou;
- Globulina antitimocítica (Thymoglobulin – Rabbit ATG – Pasteur- Mereux) na apresentação de 25mg em frasco de 5ml e posologia de 3,75mg/kg/dia, EV, 1x/dia por 5 dias, 8 a 12 horas de infusão por acesso venoso central ou;
- ATGAM (lab. Upjohn) na apresentação de 25mg em frasco de 5 ml na dose de 40mg/kg/dia por 5 dias, 8 a 12 horas de infusão por acesso venoso central.

Durante o primeiro mês após o início da globulina, o paciente fará uso de metilprednisolona a fim de reduzir os efeitos anafiláticos da droga e prevenção da doença do soro. A ciclosporina entrará em curso após a segunda semana e seguirá o mesmo protocolo de ciclosporina VO dos protocolos imunossupressores precedentes.

Tratamento de Suporte a todos os Pacientes com AAS

-Hemoterápico: deve seguir os critérios do departamento de hemoterapia do serviço. Sugere-se que o paciente use sempre componente filtrado e irradiado sempre que possível. Sempre que possível os concentrados plaquetários devem ser obtidos de aférese.

-Infeccioso: os pacientes devem ser exaustivamente orientados quanto aos sintomas de infecção, sendo febre o mais frequente deles. Nessa situação o paciente deverá procurar unidade de emergência orientada previamente pela equipe e portará sempre em mãos relatório descritivo da doença. O protocolo de neutropenia febril, quadro muito frequente entre os pacientes com anemia aplásica, deve ser seguido de acordo com os hospitais de tratamento.

Publicações

Publicações:

1-Revista : Blood, Oct 21, 2013, vol 122 no 21 1236

Blood **October 21, 2013**
vol. 122 no. 21 1236

The Interferon Gamma Gene Polymorphism In Acquired Aplastic Anemia and Its Association With HLA

**Marco Aurelio Salvino, MD^{*,1}, Marilda Souza Goncalves, PhD^{*,2},
Bruno A. V. Cerqueira, PhD^{*,3}, Larissa A Medeiros, MD^{*,4},
Flavio Lins^{*,5}, Davi Solla^{*,6}, Adriano Alcantara, MD^{*,7},
Marinho Marques, PhD^{*,8}, Alessandro Moura, MD^{*,9},
Herbert Henrique Santos, MD^{*,10}, Lais Guimaraes Souza, MD^{*,10},
Juliana Andrade, MD^{*,11}, Dora Marcia Alencar, MD^{*,10},
Daniela Dourado, MD^{*,10}, Phillip Scheinberg, MD¹², and
Roberto Mever. PhD^{*,13}**

Abstract

Introduction Idiopathic acquired aplastic anemia (AAA) is a rare and life-threatening disease, characterized by pancytopenia. Its immune-mediated physiopathology is not yet fully understood. However, important associations have been reported in AAA, which include the association with certain HLAs, the presence of a PNH clone in 40–50% of cases, occurrence of a hepatitis associated variant in about 5–10% of cases, the occurrence of interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) producing T cells in the peripheral blood and bone marrow cells. Not much is known about cytokine gene polymorphisms in AAA and its relationship with HLA alleles. The IFN- γ +874 A/T gene polymorphism, and specially the +874TT genotype, have been associated with elevated levels of IFN- γ production. The individuals can present 3 different phenotype (TT, TA or AA). Some groups have demonstrated that the TT (the IFN-gamma "hyper-producer type") is possibly overrepresented in AA patients and correlates with susceptibility to the disease. In order to better understand the relationship between these immune parameters, we investigated the associations between IFN- γ gene polymorphism in AAA patients and its relationship with the presence of HLADR15 (identified as of greater importance in our local patients).

In addition, there was NO difference between the frequency of the phenotype (TT, AT or AA) between patients with AAA and control group, respectively 16,5%, 36,5%, 46% (AAA, n =30) versus 18.1% , 35.3%, 46.6% (n = 116 control) (p=n.s.). The association of the polymorphism was tested and compared to the HLA-DR15. There was NO association between the IFN-gamma gene polymorphisms and the presence of HLADR15 (p =,90).

Conclusion In our brazilian cohort, the +874 T/A IFN-gamma gene polymorphism was Not associated with the onset of AAA. Also, there was No association between IFN-gamma gene polymorphism and the antigen HLA-DR15. TT phenotype, possibly the predisposing one for disease, was expressed only in 15% of patients with AAA. These findings corroborate the presence of a much more complex pathogenesis in AAA ,and that, regional differences in genetic and immune mechanisms may co-exist.

Disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

Materials and methods In this study we analyze the variations of the gene polymorphism at position +874 interferon in 30 consecutive patients with confirmed diagnosis of AAA,in 2012 and 2013, at the Federal University of the State of Bahia Hospital/Brazil. Diagnosis of AAA was confirmed by bone marrow biopsy. Patients also had their HLA typing and were tested for the IFN-gamma gene polymorphism at +874 T/A position using the ARMS methodology described by Pravica. As controls, 116 healthy individuals from the same population (Bahia/Brazil) were tested for these polymorphism. The analysis of the association between the gene polymorphism and the chances of developing AAA, and the polymorphism and the HLA-DR15, were performed using qui-square/exact fisher test. The results were expressed as OR.

Results We have found genotypic frequency of the A allele in 65%(n=39/60) in the aplastic patients (control 64.2%, n = 232, OR 1.05, p=0.87). The T allele was found in 35%(n =21/60)of the cases (control 34.6%, OR 0.95, p=0.87). Thus, there was no difference between the genotypic frequency of the alleles among patients with aplasia and the control group.

HLA and Aplastic Anemia: associations In Large Brazilian Cohorts

Marco Aurelio **Salvino**, MD^{*,1}, Larissa A Medeiros, MD^{*,2},
Alessandro Moura, MD^{*,3}, Marianna Batista, MD^{*,4},
Marilda Souza Goncalves, PhD^{*,5}, Eliane Mezes^{*,6}, Luciano Santos^{*,7},
Gloria Bomfim Arruda, PhD^{*,8}, Noemi Farah Pereira, PhD^{*,9},
Bruno A. V. Cerqueira, PhD^{*,10}, Anelisa Schittini, MD^{*,11},
Monica Botura, MD^{*,12}, Ana Luzia Fernandes Schriefer, MD^{*,13},
Michel M Oliveira, MD^{*,2}, Vaneuza A M Funke, MD^{*,14},
Ricardo Pasquini, MD, PhD¹⁵, Phillip Scheinberg, MD¹⁶, and
Roberto Meyer, PhD^{*,17}

Abstract

Introduction Aplastic anemia (AA) is perceived as an immune mediated disease where T-lymphocytes recognize and destroy bone marrow elements leading to varying degrees of failure of hematopoiesis. Many autoimmune diseases have been linked to certain HLA alleles and such a relationship has been also been reported in AA. Expansion of CD8+ oligoclonones has been reported in AA and likely contributes to pathogenesis. However, the interaction of CD4+ and CD8+ T cells and their targets mediated by human leukocyte antigen (HLA) class I and II peptides remain elusive. Thus, it has been speculated that polymorphic loci of these genes could be implicated in the susceptibility to the disease. Various alleles and haplotypes of HLA molecules have been implicated in the predisposition of AA development. The influence of HLA has been studied in North America, European and Asian countries. Data from Latin America, where there is a large mixture of Hispanic, European, and African descendants, is still lacking. This study focuses on the association between HLA alleles in AA patients in different regions of Brazil with particular ethnic groups.

Patients and methods From 2000 to 2013, all patients with a diagnosis of acquired AA in the Brazilian state of Bahia (BA) followed at the Federal University of Bahia Hospital/ Foundation Hemoba who tested the HLA typing were included, totaling 215 patients. In this northeast region there is a predominance of African descendant (25% white, 75% brown/black). The genes in the analysis included HLA A, B, DR and DQ. SPSS was used to statistical calculations. Qui-square test/Fisher test were using the p-value correction of *Bonferroni* (p significant <0,0016) for comparison of genetic varieties. The HLA of patients with acquired AA Bahia (n = 215) were compared to the control group (3680 healthy non-related bone marrow volunteers donors from Bahia).

To address regional differences within the country we also analyzed the HLA of AA patients (n = 344) from the State of Paraná located in the southern portion of the country and is characterized by a diverse ethnic mixture (71.3% white and 27% black/brown). Thus, we compared the findings of HLA associated with acquired AA in the two states, Bahia (northeast region) and Parana(south region). Of those statistically associated with AA (p<0,0016), we considered HLA clinically relevant only those present in at least 10% of cases and/or controls.

Results From the 559 AA patients analysed, 45,1% were women, and 54.9% were men. The mean age was 23.4 (\pm 12.3).

Among the HLA antigens with OR of risk or protection only HLA DR15 and B15, were significant, respectively (in both populations: Bahia and Parana). Identified as a risk factor for development of AA, HLA DR15 was found in 41.6% of patients (Bahia) versus 24% in controls (OR: 2.23 - CI: 1.68 to 2.9) (p <0.0001). As protective factor for AA development the HLA B15 was found in only 6% of patients (Bahia) versus 21.3% of controls (OR: 0.213, CI 0.12 to 0.370) (p <0.0001).

A stratified analysis was conducted to assess the presence of interaction between the antigens DR15 and B15 in AA patients. When analyzing synergistically, the effects of HLA DR15 and B15, we observed that, in the AA group, the positivity of DR15+ of 41,6% falls significantly to 14,8%, when concurrently with the presence of B15+. The AA risk factor of HLA DR15+ loses its statistical risk power in presence of B15+. The incidence of B15+ patients (6% in AA patients) falls to 4% in the presence of DR15 negativity (p=ns).

Conclusion We observed in 2 large AA cohorts (totaling 559 patients) from very distinct ethnic regions of Brazil, that, in both, HLA DR15 positivity was associated with a higher risk of disease, while B15 positivity was associated with a lesser likelihood of developing AA.

The synergic combination of these alleles appears to be further associated with AA development. New studies analyzing synergic effect between HLA antigens/alleles should be conducted in immuno-mediated diseases.

Disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

Publicacoes:

3-premio de melhor pôster do Congresso Brasileiro de Transplante de Medula Ossea-SBTMO- Rio de Janeiro, Agosto 2011.



SBTMO
XV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA
DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
RIO DE JANEIRO - 11 A 14 DE AGOSTO DE 2011

VI Simpósio Brasileiro em HLA e Doenças
VIII Encontro de TMO da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica
XIII Encontro de Enfermagem e Equipe
Multidisciplinar em Transplante de Medula Óssea

Centro de Convenções do Hotel Windsor Barra
Avenida Semambetiba nº 2630 - Barra da Tijuca

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho
A associação do HLA DR15 nos pacientes com aplasia medular acompanhados no HC Universidade Federal da Bahia.
do(s) autor(es)
MARCO AURELIO SALVINO, JULIANA ANDRADE, DAFNE ANDRADE, CAROLINA AUGUSTA MATOS OLIVEIRA, MARIANNA BATISTA LIMA, ALESSANDRO MOURA ALMEIDA, BRUNA GOTARDO, MARIA ELAYNE RODRIGUES SANTOS, MONICA BOTURA, HERBERT MELO SANTOS, DORA ALENCAR, DANIELA DOURADO, CAROL LISBOA, THIAGO TALLES DE FREITAS, VITOR HUGO GOMES, MARIA DA GLORIA BOMFIM, ELIANE MENEZES
foi selecionado para apresentação no formato **Pôster**
durante **XV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**
realizado de 11 à 14 de Agosto de 2011 no Windsor Barra Hotel – Rio de Janeiro


Luiz Fernando Bouzas
Presidente do Evento


Frederico Luiz Dulley
Presidente da SBTMO



Atualização / Update

**Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas:
Comitê de Hemoglobinopatias**

Brazilian Consensus Meeting on Stem Cell Transplantation: Hemoglobinopathies Committee

Belinda P. Simões¹

Fabiano Pieroni²

George M. N. Barros³

Clarisse L. Machado⁴

Rodolfo D. Cançado⁵

Marco Aurélio Salvino⁶

Ivan Angulo⁷

Julio Cesar Voltarelli⁸

Os distúrbios hereditários das hemoglobinas são as doenças genéticas mais frequentes do homem e mais difundidas no mundo, abrangendo sobretudo continentes como África, Américas, Europa e extensas regiões da Ásia. Estima-se que haja 270 milhões de portadores de hemoglobinopatias no mundo, dos quais 80 milhões são portadores de talassemia. Aproximadamente 60 mil crianças nascem anualmente no mundo com talassemia e 250 mil com anemia falciforme, dando uma frequência de 2,4 crianças afetadas para cada 1.000 nascimentos. No Brasil, a doença falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum, estimando-se que haja entre 20 a 30 mil pacientes portadores desta doença. O transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico de medula óssea (TCTH alo) é atualmente a única modalidade terapêutica capaz de curar pacientes com hemoglobinopatias. Neste artigo discutiremos os dados disponíveis na literatura e sugerimos os critérios para a indicação do TMO nas hemoglobinopatias. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010;32(Supl. 1):46-53.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias; talassemia; doenças falciformes; transplante de medula óssea.
