

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTIAS COM
DOADOR ALTERNATIVO: HAPLOIDÊNTICO OU NÃO APARENTADO EM
UM HOSPITAL PÚBLICO DE PORTO ALEGRE**

MARIANA MONTEIRO BURIN

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS COM
DOADOR ALTERNATIVO: HAPLOIDÊNTICO OU NÃO APARENTADO EM
UM HOSPITAL PÚBLICO DE PORTO ALEGRE**

MARIANA MONTEIRO BURIN

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Burin, Mariana Monteiro
Transplante de células tronco hematopoéticas com
doador alternativo: haploidentico ou não aparentado em
um hospital público de Porto Alegre / Mariana Monteiro
Burin. -- 2019.
64 f.
Orientador: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Transplante de células tronco hematopoéticas. 2.
Transplante de medula óssea. 3. Doador haploidentico.
4. Doador não aparentado. I. Silla, Lucia Mariano da
Rocha, orient. II. Título.

“He who studies medicine without books sails an uncharted sea, but he who studies medicine without patients does not go to sea at all”

William Osler

Agradecimentos

À minha família, especialmente aos meus pais, por me darem educação, valores, exemplo e todas as condições para estudar e alcançar os meus objetivos; à minha irmã Luísa, colega de profissão, pela cumplicidade durante toda a faculdade, residências e períodos de estudo; e ao meu noivo, Daniel, pelo apoio, carinho e dedicação. Sei que muitas vezes, para me dedicar ao trabalho, ao estudo, aos pacientes, deixei de estar na companhia daqueles que amo e por isso, agradeço, mais uma vez, por entenderem a minha ausência.

Agradeço também, pela oportunidade de realizar essa pós-graduação, à minha orientadora, a Dra Lucia Mariano da Rocha Silla, profissional dedicada e competente, cuja paixão pela hematologia segue inspirando outros profissionais a buscar resultados cada vez melhores para os pacientes. Agradeço também à biomédica Iânae Indiara Wilke, Doutora em Ciências Médicas, pelo auxílio no desenvolvimento de aspectos técnicos deste projeto.

Aos meus estimados professores, preceptores e colegas do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e colaboração na elaboração e realização deste projeto, em especial à Dra Tahiane de Brum Soares, por me acompanhar novamente em um novo desafio.

Agradeço aos pacientes, meus maiores professores, por me permitirem entrar em suas vidas, em momentos de tamanha fragilidade.

RESUMO

Introdução: o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, em suas diversas modalidades, é um tratamento com potencial curativo para uma série de doenças hematológicas, malignas ou benignas, e um número crescente de doenças genéticas. Nem todos os pacientes terão um doador aparentado 100% compatível disponível e precisarão de uma fonte alternativa de enxerto. Transplantes de doadores não relacionados foram feitos na maioria desses casos, mas ainda há pacientes que não conseguem encontrar um doador adequado nos registros ou não têm tempo para esperar por essa busca. Neste cenário, os transplantes com doadores haploidêntico relacionados estão ganhando mais espaço.

Materiais e métodos: Estudo de coorte retrospectivo, foram incluídos todos os pacientes submetidos a transplante alogênico de células-tronco em nosso centro, usando um doador relacionado haploidêntico (HRD) ou um doador voluntário não relacionado (URD – HLA compatível 10/10 ou HLA compatível 9/10). Foram incluídos pacientes de todas as idades, independente da doença primária que levam ao transplante. Os transplantes foram realizados entre janeiro de 2013 e junho de 2017. Também foram incluídos pacientes submetidos a um segundo transplante de células-tronco alogênicas.

Resultados: Foram incluídos 83 pacientes, 33,7% (28) transplantes HRD (HRDT), 66,3% (55) transplantes URD (URDT). Os dois grupos eram similares, exceto pelo tempo do diagnóstico da doença primária até o transplante, que no HRDT foi de 14 meses IQR (10-22), e no URDT, 24 IQR (18-51) ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística para falha primária de enxertia (HRDT 3,7% e URDT 1,9%), falha secundária de enxertia (HRDT 7,1% e URDT 1,8%), mediana de tempo para pega neutrofílica (HRDT 17 dias, URDT 19 dias) e quimerismo completo no D+30 (HRDT 85,2% e URDT 82%). Também não houve diferença com significância estatística entre os grupos no que diz respeito a complicações como: cistite hemorrágica (HRDT 21,4% e URDT 9,1%), síndrome oclusiva sinusoidal (HRDT 0% e URDT 3,6%), reativação de citomegalovírus (HRDT 75% e URDT 53,7%) ou infecção fúngica invasiva

(HRDT 50% e URDT 45,5%). A incidência cumulativa de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda grau III e IV foi de 28,6% no HRDT e 20,4% no URDT. A incidência cumulativa de doença contra o hospedeiro crônica foi de 17,9% no HRDT e 14,8% no URDT. Recaídas ocorreram em 10,7% dos HRDT e 7,3% dos URDT ($p=1$). Mortalidade relacionada ao transplante foi de 28,6% para HRDT e 40% para URDT ($p=0,319$). A Sobrevida global foi de 57,1% para o HRDT e 49,1% para o URDT ($p=0,443$). A reconstituição imune foi similar entre os grupos exceto pela mediana de IgG do D+180, 644 (536 - 769) para HRDT e 507 (422 - 599) para URDT ($p=0,028$).

Conclusão: O estudo demonstrou que, em nosso centro, os transplantes de células-tronco hematopoiéticas usando doadores haploidênticos são uma opção viável para pacientes com diversos distúrbios malignos ou benignos com resultados comparáveis aos transplantes não relacionados. Um número maior de pacientes é necessário para melhor avaliar fatores de risco e complicações em subgrupos.

Palavras-chave: transplante de células tronco, transplante de medula óssea, doador haploidêntico, doador não aparentado, reconstituição imune

ABSTRACT

Introduction: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, in its various modalities, is a treatment with curative potential for a range of hematological diseases, either malignant or benign, and an increasing number of genetic diseases. Not all patients will have a 100% matched related donor available and will need an alternative graft source. Unrelated donor transplantations have been done in most of those cases, but there are still patients not able to find a suitable match donor in the registers or do not have the time to wait for this search. In this scenario, transplantation using related haploidentical donors are gaining more relevance.

Methods: Retrospective cohort study, of all consecutive patients who underwent allogeneic stem cell transplantation at our center, using a haploidentical related donor (HRD) or a volunteer unrelated donor (URD - either 10/10 HLA allele matched or 9/10 HLA allele matched), including patients of all ages and all primary diseases leading to the transplantation. The patients were included between January 2013 and June 2017. Patients undergoing a second allogeneic stem cell transplantation were also included.

Results: A total of 83 patients were included, 33,7% (28) were HRD transplants (HRDT), 66,3% (55) URD transplants (URDT). The two groups were similar, except for time from diagnosis to transplantation: HRDT, 14 months IQR (10-22), compared to URDT, 24 months IQR (18-51) ($p < 0,001$). There was no statistically significant difference for primary graft failure (HRDT 3,7% and URDT 1,9%), secondary graft failure (HRDT 7,1% and URDT 1,8%), median time to neutrophilic engraftment (HRDT 17 days, URDT 19 days) and complete chimerism on day 30 (HRDT 85,2% and URDT 82%). There were also no statistically significant differences in complications from transplant, such as hemorrhagic cystitis (HRDT 21,4% and URDT 9,1%), Sinusoidal occlusive syndrome (HRDT 0% and URDT 3,6%), cytomegalovirus reactivations (HRDT 75% and URDT 53,7%) or Invasive fungal infection (HRDT 50% and URDT 45,5%). Cumulative incidence of GVHD III and IV was 28,6% for HRDT and 20,4% for URDT. The cumulative incidence of chronic GVHD was 17,9% for

HRDT and 14,8% for URDT. Relapsed disease occurrence was 10,7% in HRDT and 7,3% in URDT ($p=1$). Non-relapse mortality was 28,6% for HRDT and 40% for URDT ($p=0,319$). Overall survival was 57,1% for HRDT and 49,1% for URDT ($p=0,443$). Immune reconstitution was similar in both groups, except for median D+180 IgG, 644 (536 - 769) for HRDT and 507 (422 - 599) for URDT ($p=0,028$).

Conclusion: Our results showed that haploidentical transplants results in our center are comparable to unrelated transplants for patients with diverse malignant or benign disorders. To better access risk factors and complications in subgroups we need to increase the number of patients and follow-up.

Keywords: Stem cell transplant, bone marrow transplant, haploidentical donor, unrelated donor, immune reconstitution

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégia para a busca de referências bibliográficas.....	17
Figura 2 Condicionamento e profilaxia de doença do enxerto contra o hospedeiro em transplante haploidêntico segundo protocolo da John Hopkins University.....	25
Figura 3 - Marco Conceitual	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Severidade em função do órgão afetado - Estadiamento clínico - laboratorial.....	26
Tabela 2 - Grau de severidade das manifestações da doença do enxerto contra o hospedeiro.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSCUP: Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário

DECH: Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

DLA: *Dog Leukocyte Antigens*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DSA: *Donors Specific Antibodies HLA Human Leukocyte Antigen*

IgG: Imunoglobulina G

INCA: Instituto Nacional Do Câncer

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crônica

MAC: *Major Histocompatibility Complex*

NK: *Natural Killers Cells*

OS: Sobrevida Global

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

REDOME: Registro de Doadores de Medula Óssea

REREME: Registro de Receptores de Medula Óssea

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

SBT: Sequenciação Nucleotídica (*Sequence Based Typing*)

SCID: Imunodeficiência Combinada Grave

SMD: Síndrome Mielodisplásica

SSOP: *Sequence Specific Oligonucleotide Probes*

SSP: *Sequence Specific Priming*

TBI: *Total Body Irradiation*

TCTH: Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	17
2.2. O transplante alogênico.....	17
2.3. O sistema HLA	18
2.4. O transplante alogênico não aparentado e as técnicas de identificação do HLA	20
2.5. A criação dos registros de doadores de medula óssea e os desafios na busca de um enxerto.....	20
2.6. O transplante haploidêntico.....	23
2.7. Complicações do transplante de medula óssea	25
2.7.1. A doença do enxerto contra o hospedeiro.....	25
2.7.2. As complicações infecciosas do transplante de medula óssea.....	27
2.7.3. Outras complicações do transplante de medula óssea.....	28
3. MARCO CONCEITUAL	30
4. JUSTIFICATIVA.....	31
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. Objetivos Gerais	32
5.2. Objetivos Específicos	32
6. POPULAÇÃO EM ESTUDO E RECRUTAMENTO.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
7. VARIÁVEIS E INSTRUMENTOS DE COLETA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8. DELINEAMENTO DO ESTUDO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
11. ARTIGO EM INGLÊS: UNRELATED AND HAPLOIDENTICAL DONORS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTS, SINGLE CENTER, SOUTHERN BRAZIL EXPERIENCE.....	41

1. INTRODUÇÃO

O transplante de células tronco hematopoiéticas, mais conhecido como transplante de medula óssea, é tratamento indicado para uma série de patologias, não restritas ao campo da hematologia. O seu aperfeiçoamento e aumento de segurança em suas técnicas, assim como o desenvolvimento da medicina de forma global, para fins de proporcionar tratamento de suporte, tem aumentado ao longo do tempo as suas indicações, permitindo que um número maior de pacientes, com patologias e diversas, possa ser beneficiado por este tratamento^{1,2}.

O transplantes de células tronco hematopoiéticas pode ser classificado, conforme a fonte do enxerto, em: autólogo (o paciente recebe suas próprias células tronco, previamente coletadas), aparentado com 100% de compatibilidade (doador é um irmão), aparentado com um haplótipo compatível/doador haploidêntico (o doador é um familiar com 50% de compatibilidade), não aparentado (doador não relacionado, com compatibilidade 100% ou *mismatch* aceitável). A fonte do enxerto pode também ser células tronco de um cordão aparentado ou de um banco de cordão (não aparentado).

No início da história dos transplantes alogênicos, apenas era possível a doação entre familiares para a realização com segurança dos transplantes de medula óssea, pelas limitações técnicas no conhecimento do HLA. A necessidade de pacientes sem doadores aparentados realizarem o procedimento levou a avanços na área até se tornarem viáveis as doações de enxertos não aparentados e formação de cadastros mundiais de doadores a fim de encontrar um doador compatível para todos os pacientes que necessitavam realizar o procedimento³.

No entanto, mesmo com a disponibilidade dos registros de doadores e mais recentemente dos bancos de cordões umbilicais, parte dos pacientes ainda seguia sem doador disponível. Neste cenário, o transplante haploidêntico mostrou-se como uma alternativa.

A base de todo o transplante alogênico consiste em realizar um período de quimioterapia (condicionamento) para destruição das células tronco hematopoiéticas do receptor, seguida da infusão das células tronco do doador e posteriormente algum grau de imunossupressão para que não haja rejeição tanto do enxerto pelo receptor e nem o acontecimento de doença do enxerto contra o hospedeiro por ativação de células do sistema imune do doador.

No passado, quando foram feitas tentativas de transplante haploidêntico elas não apresentaram sucesso. Como o sistema imune dos envolvidos discordava em 50%, a aloreatividade era muito intensa e esses pacientes acabavam por falecer de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda ou necessitavam de imunossupressão tão intensa que acabam por falecer de infecção. Foi-se, ao longo do tempo, realizado técnicas de depleção linfocitária *ex-vivo*, uma vez que os linfócitos T estão intimamente ligados a doença do enxerto contra o hospedeiro, para realização destes transplantes em alguns centros^{4,5}. No entanto, estes procedimentos sempre foram muito complexos e de alto custo, limitando sua realização. Esse cenário mudou após a publicação da experiência da *John Hopkins University*, em 2008, que desenvolveu uma técnica de depleção linfocitária *in vivo* com uso de ciclofosfamida após o transplante que permitiu a realização do procedimento em diversos centros do mundo⁶.

Apesar de resultados promissores, a maioria dos artigos publicados refere-se a pacientes com doenças hematológicas malignas tratadas em centros localizados em países de primeiro mundo. Há poucos dados disponíveis sobre transplante haploidêntico no contexto de doenças benignas, e em países em desenvolvimento, em que o perfil dos pacientes é muitas vezes diferente, por dificuldades de acesso ao sistema de saúde. Outro questionamento que está sendo feito à nível mundial, é, se o transplante haploidêntico, com seu menor custo e disponibilidade de doador poderia substituir o não aparentado em suas indicações.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura foi feita através da revisão de artigos científicos publicados em jornais, periódicos e revistas nacionais e internacionais. Esta revisão teve como objetivo obter dados sobre o transplante de células tronco hematopoiéticas haploidêntico e não aparentado, incluindo dados sobre a sua técnica e seus diversos desfechos. Esta busca foi feita através da base de dados do PubMed utilizando-se associado e/ou isoladamente às palavras-chave: “*stem cell transplant or bone marrow transplant*”, “*haploidentical donor*”, “*unrelated donor*”, “*immune deficiency*”, “*immune reconstitution*”, “*benign disease*”, conforme apresentado na figura 1.

Figura 1 - Estratégia para a busca de referências bibliográficas

Palavras-chave	Artigos Encontrados
1. Stem cell transplant or bone marrow transplant	170374
2. Haploidentical donor	1661
3. Unrelated donor	9789
1+2	1511
1+3	6466
1+2+3	317
2+4	149
2+5	163
2+6	4

Palavras-chave
 1. Stem cell transplant or bone marrow transplant
 2. Haploidentical donor
 3. Unrelated donor
 4. Immune deficiency
 5. Immune reconstitution
 6. Benign disease

Fonte: elaborado pelo autor.

2.2. O transplante alogênico

O transplante alogênico de medula óssea ou transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, em suas diversas modalidades, é um tratamento com potencial curativo para uma série de doenças hematológicas, sendo elas malignas ou benignas, e um número cada vez maior de doenças

genéticas^{1,7}. A base do tratamento consiste na infusão de células tronco hematopoiéticas de um doador geneticamente similar, após algum tipo de supressão medular no receptor. O aperfeiçoamento da técnica, os avanços em biologia molecular, nos cuidados do paciente, no suporte transfusional, na disponibilidade de imunossuppressores e antibióticos e na seleção dos doadores, permitiu que esta terapia fosse oferecida com mais segurança e a um maior número de pacientes ao longo dos anos^{2,8}.

Os estudos relacionados ao transplante de medula óssea tiveram início após a segunda guerra mundial, quando aumentou a curiosidade com os efeitos da radiação⁹. Em 1949, Jacobson *et al*¹⁰, evidenciou que a proteção do baço em camundongos irradiado, permitia a sobrevivência dos mesmos. Posteriormente, Lorenz *et al*¹¹, publicou um experimento semelhante, em que a infusão de células do baço, após a irradiação, permitia a sobrevivência dos camundongos. Em 1955, Main e Prehn relataram um caso de um camundongo que após irradiação, recebeu uma infusão de células esplênicas alogênicas, e posteriormente um enxerto de pele do mesmo doador, sem rejeição aparente¹². E, em 1956, Ford *et. al*, resgataram com células progenitoras hematopoiéticas um camundongo que recebeu dose letal de irradiação¹³.

Posteriormente, ainda em experimentos em modelo animal, foi identificado uma complicação, chamada de “*second disease*”, que acometia o receptor após o transplante. Hoje sabemos que se tratava de doença do enxerto contra o hospedeiro, causada por linfócitos T ativados do doador, que causam danos em diversos tecidos do receptor^{9,14}. Nesta mesma época (década de 50 e 60), foram feitos estudos, especialmente em cães, com uso de metotrexato, como imunossupressor, para diminuir a reação imunológica^{9,15}. Foi observado também, que, quando se transplantavam cães da mesma ninhada, com *dog leukocyte antigens* (DLA) idênticos, obtinha-se melhores resultados, tanto em relação a doença do enxerto contra o hospedeiro, como sucesso da enxertia (ausência de falha de pega e perda do enxerto)^{9,16,17}.

2.3. O sistema HLA

O primeiro transplante de medula óssea que obteve êxito em humanos ocorreu em 1958, como tratamento para leucemia, e o seu sucesso

se deve ao fato de ser um transplante singênico¹⁸. O sucesso de um novo transplante de medula óssea só ocorreu novamente em 1968¹⁹, após o maior conhecimento sobre o sistema HLA (*human leukocyte antigen*). O HLA é uma classe de proteínas presente na superfície das células com grande papel na identificação de “*self*” e “*non self*” pelo sistema imune. Os genes responsáveis por codificar as moléculas do HLA estão presentes no cromossomo 6, fazendo parte de um segmento gênico denominado *major histocompatibility complex* (MHC). O segmento gênico que envolve o MHC abrange os antígenos de classe I, com três loci envolvidos no transplante, HLA-A, HLA-B e HLA-C, assim como os de classe II, HLA-DQ e HLA-DR. Há outros antígenos do complexo HLA-DP e outros fora do cromossomo 6, de significado ainda incerto no transplante de células tronco hematopoiéticas²⁰.

A proximidade física entre os genes do HLA determina a sua herança em haplótipos. A taxa de recombinação gênica (*crossing over*) é inferior a 2%, o que resulta em sua transmissão em bloco, respeitando os padrões de herança mendeliana simples, ou seja, a chance de dois irmãos apresentarem os mesmos haplótipos ou não terem nenhum haplótipo em comum é de 25%, e a chance de compartilharem apenas um haplótipo é de 50%^{21,22}. No final da década de sessenta, esse conhecimento, aliado a identificação sorológica de compatibilidade HLA, impulsionou o número de transplantes e consolidou a sua indicação em casos de leucemia e anemia aplásica^{9,23}.

Nesta época, a identificação do HLA era feita com a técnica sorológica, que nasceu da observação de anticorpos criados após gestação ou transfusão de hemoderivados, capazes de reagir a antígenos leucocitários. Estas observações deram origem ao teste linfocitotóxico, que foi amplamente utilizado na abordagem sorológica para identificação dos antígenos do sistema HLA. Esta técnica consiste na mistura de linfócitos B com soro contendo anticorpos específicos para determinados antígenos do sistema HLA. Os anticorpos, quando na presença de linfócitos B contendo antígenos complementares ligam-se provocando, com a adição de um complementar, a destruição da membrana o que permite a sua identificação por coloração^{24,25}. Esse método está em desuso.

2.4. O transplante alogênico não aparentado e as técnicas de identificação do HLA

O Primeiro transplante alogênico não aparentado aconteceu em 1973. No entanto, esta modalidade do procedimento só apresentou melhora nos seus desfechos após a década de noventa, quando métodos de identificação do HLA complementares ao sorológico começaram a ser usados. A grande dificuldade na correta avaliação de doadores e receptores, se dá pelo fato do MHC ser o sistema mais polimórfico na espécie humana. A evolução das técnicas de caracterização do sistema HLA, se deu inicialmente através da leuco-aglutinação, que permitiu a identificação de antígenos relacionados aos genes que compõem o sistema HLA²⁶. Até os anos 80, a única forma de determinar a diversidade alélica do sistema HLA se dava através de testes sorológicos. Entretanto, devido a reações cruzadas e impossibilidades de aquisição de alguns anticorpos, as técnicas moleculares surgiram como promissoras para caracterização deste sistema. Assim, os testes sorológicos passaram a ser utilizados apenas para validação de potenciais doares²⁷.

O início da identificação “genética” alélica, se deu através dos métodos de restrição enzimática (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism), que em comparação aos testes sorológicos permitiram uma maior precisão. Posteriormente, com o surgimento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), a caracterização alélica do sistema HLA em alta performance, com elevado grau de eficiência e resolução nos resultados, tornou-se possível através da associação da mesma com a técnica de RFLP. Esta associação, consiste na amplificação pela PCR de uma região do DNA, através de primers complementares a sítios específicos e subsequente corte, ou seja, ocorre a amplificação dos exons polimórficos do locus do HLA selecionado, que posteriormente será digerido por enzimas de restrição específicas, onde serão gerados fragmentos de DNA que posteriormente serão separados por eletroforese para análise^{28, 29, 30}.

Além desta associação, diversas outras técnicas foram desenvolvidas com base na reação da cadeia da polimerase. Dentre elas destacam-se o teste SSP (Sequence Specific Priming), a caracterização alélica por SSOP

(Sequence Specific Oligonucleotide Probes) e a sequenciação nucleotídica (SBT- Sequence Based Typing). O SSP utiliza como princípio oligonucleotídeos complementares à sequências de nucleotídeos polimórficos conhecidas^{31,32}. Já o SSOP utiliza primers complementares de zonas conservadas para amplificar os exons polimórficos dos loci HLA, neste caso os exons 2 e 3 para genes de HLA classe I e exon 2 nos genes de HLA classe II³³. Por fim, o SBT se dá pela amplificação dos fragmentos contendo os exons polimórficos que serão posteriormente sequenciados e que através de um programa informatizado caracterizará os alelos presentes em cada amostra. Destas, o SBT é o teste molecular de maior acurácia, uma vez que possibilita a identificação de novos alelos^{33, 34, 35}.

2.5. A criação dos registros de doadores de medula óssea e os desafios na busca de um enxerto

Os avanços na identificação de HLA, que permitiram maior segurança na escolha de um doador não aparentado e conseqüentemente melhor resultado nos transplantes não aparentados, levaram a criação de cadastros mundiais de doadores voluntários. Atualmente, o cadastro com maior número de doadores é o americano, criado em 1986, com 7,9 milhões de doadores registrados, seguido pelo alemão, com 6,2 milhões. No Brasil, o REDOME (Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea), foi criado em 1993, e recentemente chegou a marca de 4 milhões de doadores registrados, sendo o terceiro maior cadastro do mundo. Segundo dados do próprio INCA (Instituto Nacional do Câncer), a chance de se identificar um doador compatível, no Brasil, é de 64%, podendo a procura ser expandida para registros colaborativos mundiais na ausência de um doador nacional. Em 2001, o INCA, seguindo tendências mundiais, inaugurou o Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP), seguido por outros centros no Brasil e em 2004 foi criado o BrasilCord (unindo os cadastros de BSCUPs públicos), na tentativa de disponibilizar mais uma fonte possível de células tronco hematopoiéticas, contudo, pela baixa celularidade disponíveis nesta coleta, o seu uso se restringe mais a pacientes pediátricos^{35,36,37}.

Apesar dos diversos avanços na área do transplante de células tronco hematopoiéticas, na ampliação dos registros de doadores e na correta identificação a nível molecular dos mesmos, a disponibilidade de uma fonte de células tronco hematopoiéticas e a sua escolha ainda são uma etapa crítica do transplante. Estima-se que menos de um terço dos pacientes têm um doador familiar 100% compatível disponível, e que, apesar dos bons resultados alcançados com o transplante não aparentado, que em muitos estudos já tem desfechos semelhantes ao do aparentado^{38,39}, nem todos os pacientes vão achar um doador no banco.

Como dito anteriormente, a chance de achar um doador no banco brasileiro é de 64%, podendo ainda recorrer aos registros mundiais. Mas mesmo assim, não são todos os pacientes que conseguem doadores apropriados, por vezes, havendo apenas doadores com *mismatches* (não 100% compatíveis) disponíveis, o que aumenta os riscos do procedimento. Além do mais, registros de doadores apresentam uma sub-representação de algumas etnias, o que diminui significativamente a chance de alguns pacientes de encontrarem um doador adequado. O registro brasileiro conta com 73% de doadores autodeclarados brancos, 12% negros e 10% pardos⁴⁰. Há sub-representação de populações afrodescendentes, asiáticas e indígenas. Há também grande disparidade em relação a origem dos doadores. Nos últimos anos, esforços tem sido feito para corrigir diferenças regionais, mas há uma concentração de doadores provenientes do sul e do sudeste brasileiro e uma sub-representação da região norte do Brasil, pelas diferenças históricas de colonização e migração da população brasileira, essas discrepâncias geográficas podem refletir em maior dificuldade em se achar um doador. Outra peculiaridade do Brasil que prejudica a identificação de doadores compatíveis é a nossa diversidade étnica. Estudos de HLA da população brasileira mostram presença de alelos de diversas populações ameríndias, do norte africano e África subsaariana e diversas partes do continente europeu, somos uma sociedade diversificada e miscigenada e isso influí na frequência de alelos⁴¹.

O uso de células tronco provenientes de cordão tem como grande limitante o volume de células disponíveis, o custo a demora da pega

medular^{42,43}. Neste contexto, o transplante haploidêntico vem ganhando espaço.

2.6. O transplante haploidêntico

O transplante haploidêntico consiste em usar um doador aparentado que tenha um haplótipo idêntico ao do receptor, neste caso os pais, filhos e possivelmente os irmãos (possibilidade de 50% de chance de compatibilidade entre irmãos). No entanto, o uso de enxertos com incompatibilidade HLA estão associados com intensa aloreatividade bidirecional, em que o sistema imune do receptor tenta eliminar células do doador (rejeição, falha de pega) e as células do doador atacam os tecidos do receptor (doença do enxerto contra o hospedeiro). Os primeiros estudos fazendo uso destes doadores resultaram em alta mortalidade e toxicidade. As drogas usadas de rotina para controle do DECH nas demais modalidades de transplante não foram suficientes para controlar a aloreatividade e houve uma grande incidência de DECH grau III e IV, além de descrição de casos compatíveis com DECH hiperagudo⁴. A prevalência de DECH crônico também foi maior quando comparado a outras modalidades de transplante. Somada a estas complicações, ainda houve uma incidência maior de demora e falha na pega. Em 1997, um estudo da *International Bone Marrow Transplant Registry*, que incluiu 2,055 pacientes, tratados com transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas entre 1985–1991, com diversos tipos de doadores, confirmou a grande mortalidade associada ao transplante haploidêntico e esta modalidade foi praticamente abandonada^{4,5}.

O transplante haploidêntico só ganhou espaço novamente após o desenvolvimento de técnicas de depleção de linfócitos T (principais células envolvidas na fisiopatologia do DECH). Estudos com roedores demonstraram que inoculados de células fetais hepáticas (pobre em linfócitos T), e posteriormente outros modelos de enxertos depletados em células T eram capazes de impedir uma DECH letal⁴⁴. O primeiro transplante haploidêntico realizado em humanos, no final da década de setenta, em um paciente com imunodeficiência combinada, utilizou um método imunológico para a depleção de linfócitos T⁴⁵. Desde então, foram desenvolvidos uma série de métodos

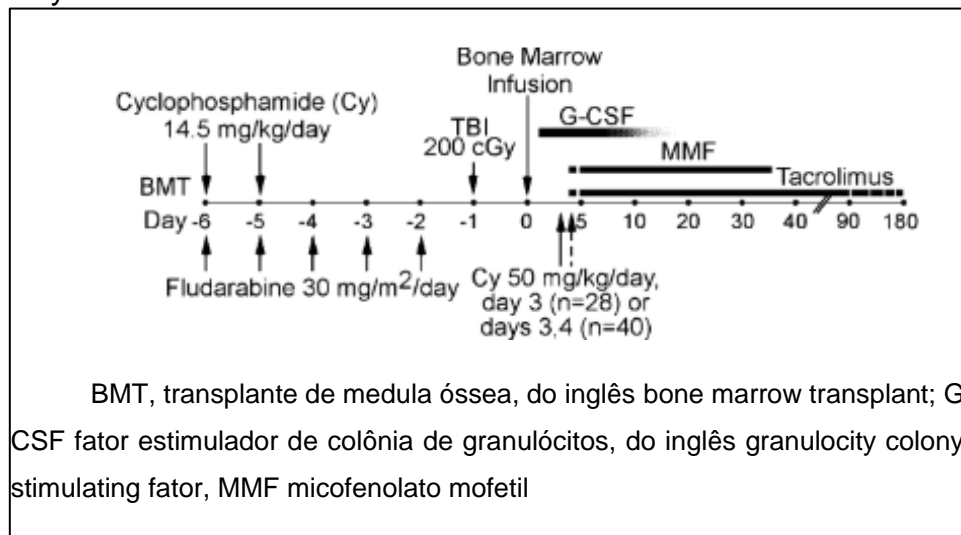
físicos (fração de gradiente de densidade, *centrifugal elutriation*) e imunológicos (timoglobulina, CAMPATH-1, anticorpos monoclonais, anticorpos conjugados a *beads* magnéticas) muitas vezes usados em conjunto, para realizar a depleção linfocitária^{4,5}. No entanto, há limitações técnicas e financeiras para o emprego destes métodos na maioria dos centros. O grande responsável pela difusão do transplante haploidêntico foi o uso da depleção linfocitária em vivo, após a infusão de células tronco, com a ciclofosfamida⁴⁶.

A ciclofosfamida é um agente antineoplásico com alto poder imunossupressor. No contexto do transplante de células tronco hematopoiéticas, a droga é usada tradicionalmente no regime de condicionamento do receptor, com papel na prevenção de rejeição do enxerto. No entanto, o uso da ciclofosfamida após a infusão do enxerto, previne a aloreatividade em suas duas vias: impede a rejeição por depleção dos linfócitos do receptor e diminui a incidência de DECH pelo seu efeito nos linfócitos T do doador⁴⁶. O uso da ciclofosfamida em altas doses pós transplante foi proposto pela primeira vez em 1960, através de estudos em roedores que receberam enxertos alogênicos de pele⁴⁷. Ocorria uma promoção da enxertia, pela depleção dos linfócitos, mas sem toxicidade das células tronco hematopoiéticas, uma vez que elas são mais resistentes a esse agente citotóxico que os linfócitos, devido aos seus altos níveis de aldeído desidrogenase, que inativam o metabólito da droga^{4,46}.

Luzinik *et al*, da John Hopkins University, publicou em 2008 um artigo com 68 casos de transplante haploidênticos usando uma técnica de condicionamento não mieloablativos e ciclofosfamida pós transplante para prevenção de DECH que, por seus resultados e reprodutibilidade, impulsionou a realização do transplante haploidêntico em nível mundial. O protocolo, atualmente referido como *John Hopkins University Protocol*, consiste em: ciclofosfamida 14,5mg/Kg/dia, endovenoso, nos dias -6 e -5, fludarabina 30mg/m²/dia, endovenoso, nos dias -6, -5, -4, -3 e -2 e 200 Gy de *total body irradiation* (TBI) no dia -1. O paciente recebe a infusão de células tronco no dia zero e no dia 3 ou no dia 3 e 4, recebe 50mg/kg de ciclofosfamida, em infusão venosa de 90 minutos, junto com a mesna (80% da dose de ciclofosfamida, dividida em 4 infusões, em 8h). No dia 5, inicia-se fator estimulador de colônia

de granulócitos (filgrastima) 5ug/kg/dia (até pega medular), tacrolimus e micofenolato mofetil⁶.

Figura 2 Condicionamento e profilaxia de doença do enxerto contra o hospedeiro em transplante haploidêmico segundo protocolo da John Hopkins University.



Fonte: adaptado de Luzinik *et al*, 2008.

2.7. Complicações do transplante de medula óssea

2.7.1. A doença do enxerto contra o hospedeiro

A doença do enxerto contra o hospedeiro, como mencionado anteriormente, na sua forma aguda, é mediada por linfócitos T do doador, que são apresentados a antígenos do receptor, através de células apresentadoras de antígenos. Esse processo é intensificado pois os tecidos do receptor sofreram danos pela doença, quimioterapia e radioterapia, o que estimula mais a ativação e proliferação de células inflamatórias. Essas células passam por diferenciação e migração, causando novos danos no tecido lesionado e provocando maior liberação de antígenos que retroalimentam o processo. Na sua forma aguda, o DECH acomete principalmente pele, trato gastrointestinal e fígado, havendo uma classificação aceita mundialmente para definir intensidade e guiar o tratamento (Tabela 1 e 2)^{48,49}.

Os mecanismos da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica não estão tão bem elucidados, mas também há participação de linfócitos T alloreativos ativados. A fisiopatologia parece ser semelhante à de doenças

autoimunes e o acometimento bastante variado, podendo se manifestar em pele, mucosas, músculos, tendões, aparelho respiratório, ocular e outros^{48,50,51}.

Tabela 1 - Severidade em função do órgão afetado - Estadiamento clínico - laboratorial

Estágio	Pele	Fígado	Trato Gastrointestinal
1	Rash maculopapuloso <25% da superfície corporal	Bilirrubina 2-3 mg/dl (34-50 µm/l)	Diarreia < 1000 ml/dia (na ausência de causa infecciosa) (<15 ml/Kg/dia) náuseas e vômitos ou anorexia (comprovação histológica)
2	Rash maculopapuloso de 25 a 50% da superfície corporal	Bilirrubina 3,1-5,9 mg/dl (51-102 µm/l)	Diarreia > 1000 ml /dia (>15 ml/kg/dia)
3	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina 6-14,9 mg/dl (103-255 µm/l)	Diarreia > 1500 ml/d (>20 ml/kg/dia)
4	Eritrodermia generalizada com formação de bolhas e descamação	Bilirrubina >15 mg/dl	Diarreia 2000 ml/dia (25 ml/Kg/dia), sangramento ou íleo

Fonte: Adaptado de *National Institutes Of Health Consensus Criteria*.

Tabela 2 - Grau de severidade das manifestações da doença do enxerto contra o hospedeiro

GRAU	Estágio Pele	Estágio Digestivo	Estágio Fígado
I	1 a 2	0	0
II	0 a 3	0-1	0-1
III	0 a 3	2-4	0-4
IV	0 a 3*	2-4*	0-4*

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

Fonte: Adaptado de *National Institutes Of Health Consensus Criteria*.

2.7.2. As complicações infecciosas do transplante de medula óssea

Encontrar um doador adequado e realizar profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro é apenas o início do processo em um transplante de células tronco hematopoiéticas. Para analisar o sucesso de uma técnica é necessário acompanhar a presença de outras complicações do procedimento.

Os pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas apresentam, em quase sua totalidade, ao menos um episódio de neutropenia febril, em geral, de causa bacteriana⁵². No entanto, há outras infecções comuns nos primeiros cem dias de um transplante com alta mortalidade e morbimortalidade, entre as principais estão as infecções fúngicas invasivas e a reativação de citomegalovírus.

A infecção fúngica invasiva continua sendo uma das principais causas de óbito por infecção nos pacientes submetidos a transplante de medula óssea, por esta razão, uma série de controles em relação ao ambiente e alimentação dos pacientes são impostas para minimizar a exposição. As infecções fúngicas estão relacionadas aos períodos prolongados de neutropenia, imunossupressão, infecção por citomegalovírus, DECH e uso de corticoide⁵³.

As infecções por *Candida* ocorrem, em geral, nos primeiros dias após o transplante, pois estão muito associadas a neutropenia, mucosite e a presença de acesso venoso central. A sua incidência apresentou redução após início de profilaxia para os pacientes transplantados com fluconazol ou equinocandinas. Há aumento das infecções por *Candida* em pacientes em períodos mais tardios do transplante que apresentam DECH e necessitam imunossupressão^{52,53}.

As infecções por outros fungos que não *Candida* tem apresentado incidência crescente nos pacientes transplantados de medula óssea e alta letalidade⁵³. O principal agente é o *Aspergillus*, seguido por *Fusarium sp* e pelas mucormicoses. Há indicação de profilaxia primária e secundária para essas infecções em pacientes de alto risco, em geral com voriconazol ou posaconazol⁵².

A infecção por citomegalovírus (CMV) pode apresentar-se de formas variadas, podendo ser uma infecção primária, uma reinfecção ou uma

reativação do vírus. Estima-se que entre 32 a 70% de todos os pacientes submetidos a transplante apresentem alguma forma de infecção pelo CMV, e de 30 a 40% vão apresentar manifestações clínicas significativas da doença. A reativação da infecção por citomegalovírus é muito prevalente e ocorre em cerca de metade dos pacientes que apresentam sorologia positiva prévia ao transplante (o que no nosso meio chega a quase 90%)^{53,54}.

A infecção viral pode se manifestar de diversas formas: pneumonia intersticial, acometimento do trato gastrointestinal (colite, esofagite, formação de úlceras), pancitopenia, acometimento de sistema nervoso central, acometimento ocular (retinite) entre outros^{52,54}. Pela potencial gravidade das infecções por CMV, há indicação de monitorização dos pacientes por testes de antigenemia para citomegalovírus ou CMV DNA quantitativo por PCR seguido de terapia pre-emptiva. Esse monitoramento é fundamental nos primeiros quatro meses pós TCTH, quando ocorrem a maior parte das infecções⁵².

São fatores de risco associados a infecção por citomegalovírus no transplante alogênico o uso de doadores não aparentados (comparados a doadores aparentados 100% compatíveis), enxerto proveniente de cordão, uso de timoglobulina ou TBI no condicionamento, pacientes com idade avançada e a necessidade de maior imunossupressão. Como a infecção por citomegalovírus está intimamente ligada com a deficiência de células T CD4+, a reconstituição imune do paciente é fator determinante. Ainda não está claro se o transplante haploidêntico isoladamente é um fator de risco para infecções por CMV, apesar de algumas publicações assim o sugerirem^{55,56}.

2.7.3. Outras complicações do transplante de medula óssea

A cistite hemorrágica ocorre por lesão do endotélio da bexiga urinária. Essa lesão pode ocorrer pela radioterapia, por drogas usadas no condicionamento (bussulfano, ciclofosfamida, tiotepa) ou por infecções virais facilitadas pela imunossupressão (citomegalovírus, BK vírus, adenovírus). As manifestações vão desde hematúria microscópica até hematúria franca com formação de coágulos, obstrução do trato urinário e insuficiência renal. A incidência da cistite hemorrágica varia bastante nas publicações, estando entre

12 a 42% dos casos. Apesar de raramente levar a óbito, é grande causa de morbidade e prolongamento de internação hospitalar^{57,58}.

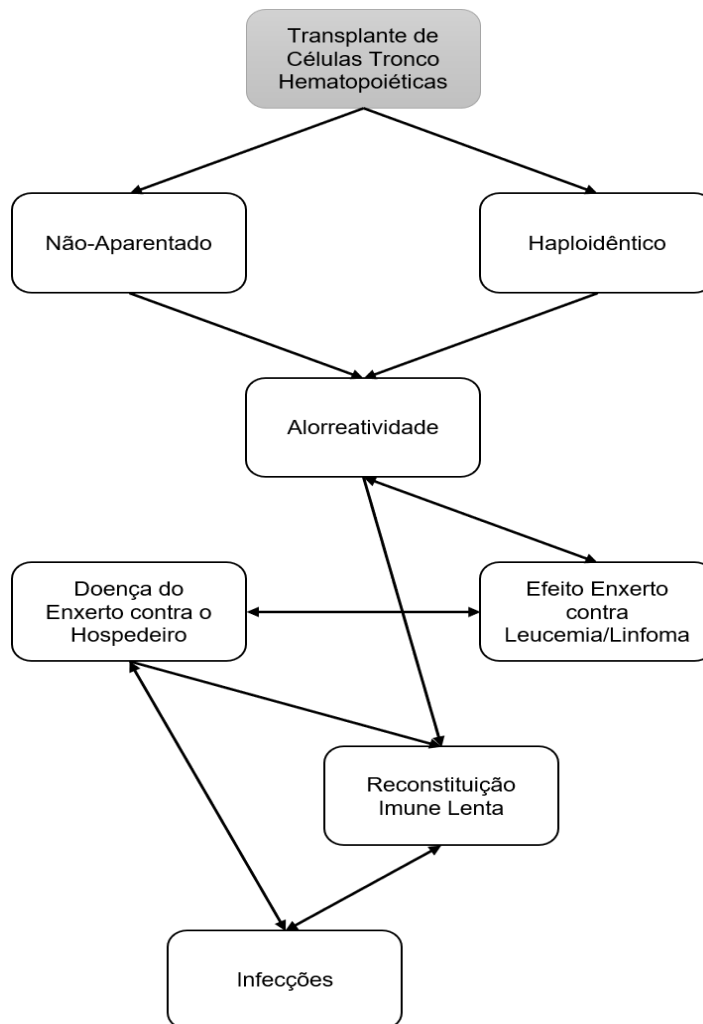
A síndrome sinusoidal veno-oclusiva é uma complicação presente tanto no transplante de células tronco autólogo como no alogênico e esta relacionada a toxicidade do condicionamento. Ela ocorre por lesão do endotélio hepático sinusoidal levando a alterações de permeabilidade capilar, ativação da cascata de coagulação e lesão hepática. As manifestações incluem ganho de peso, ascite, dor em hipocôndrio direito, hiperbilirrubinemia, aumento de fosfatase alcalina, trombocitopenia refratária a transfusão e insuficiência renal⁵⁹.

A incidência desta complicação é muito variável na literatura, estando entre 5 e 70%. Os fatores de risco associados são: doença hepática prévia, condicionamento, TBI, doador não aparentado, uso de bussulfano ou metotrexato e transplante de medula óssea prévio⁵⁹.

Recentemente, vem ocorrendo a publicação de estudos retrospectivo comparando pacientes que receberam doador não aparentado com pacientes que receberam células tronco hematopoiéticas de doadores haploidênticos. Apesar do número ainda pequeno de pacientes e das diversas variáveis envolvidas, não parece haver diferença entre sobrevida global, sobrevida livre de recaída e mortalidade relacionada ao transplante entre os grupos^{6,60,61,62}. No entanto, não há estudos randomizados ou prospectivos sobre o tema e há ainda poucos dados relativos a população brasileira e suas particularidades genéticas, portanto o presente estudo pretende avaliar os resultados destas diferentes modalidades em nosso meio e, em particular, na nossa Instituição.

3. MARCO CONCEITUAL

Figura 3 - Marco Conceitual



Fonte: elaborado pelo autor.

4. JUSTIFICATIVA

A modalidade de TCTH alogênico chamada de haploidêntico surgiu devido a necessidade de encontrar doadores alternativos em casos em que o TCTH é imprescindível, e não há disponibilidade de doador compatível na família ou nos bancos de doadores de medula óssea. Hoje o transplante haploidêntico vem sendo realizado de forma crescente mundialmente. Estudos recentes têm comparado dos resultados dessa modalidade com o transplante não aparentado, que já tem resultados bem consolidados na literatura. Este trabalho surgiu da necessidade de melhor analisarmos os nossos resultados como centro transplantador diante desta nova realidade. Acreditamos na importância de coletarmos dados da nossa experiência desde o primeiro transplante haploidêntico deste serviço e comparar com os dados dos transplantes não aparentado que foram realizados neste mesmo período.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos Gerais

Avaliar os desfechos clínicos e sobrevida de pacientes que foram submetidos a Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) nos subtipos aparentado haploidêntico e não aparentado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de janeiro de 2013 a junho de 2017.

5.2. Objetivos Específicos

- Avaliação de dados clínicos e prognósticos, bem como análise de sobrevida para cada uma das modalidades de transplante descritas.

- Avaliação de taxa de mortalidade relacionada ao transplante em cada uma das modalidades.

- Comparação entre essas duas modalidades de transplante alogênico no que diz respeito a taxa falha de enxertia, tempo para pega medular, tempo de internação, mortalidade precoce, taxa de infecções, taxa de reativação de infecção por vírus Citomegalovírus (CMV), incidência de Doença do Enxerto Contra Hospedeiro aguda e crônica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Niederwieser, D., Baldomero, H., Szer, J., Gratwohl, M., Gratwohl, A. (2016, 02). Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplantation*, 51(6), 778-785. doi:10.1038/bmt.2016.18
2. Hematopoietic Cell Transplantation, 3(2), 39-48. doi:10.7889/hct.3.39 Little, M., & Storb, R. (2002, 03). History of haematopoietic stem-cell Transplantation. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 231-238. doi:10.1038/nrc748
3. Hurley CK, Vina MF, Setterholm M. Maximizing optimal hematopoietic stem cell donor selection from registries of unrelated adult volunteers. *Tissue Antigens*. 2003;61(6):415-424. doi:10.1034/j.1399-0039.2003.00096.x
4. Or-Geva, N., & Reisner, Y. (2015, 12). The evolution of T-cell depletion in haploidentical stem-cell transplantation. *British Journal of Haematology Br J Haematol*, 172(5), 667-684. doi:10.1111/bjh.13868
5. Naik, S., & Heslop, H. E. (2015, 05). Engineering haploidentical transplants. *Bone Marrow Transplant Bone Marrow Transplantation*, 50(7), 884-885. doi:10.1038/bmt.2015.115
6. Luznik, L., O'donnell, P. V., Fuchs, E. J. (2008, 06). HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14(6), 641-650. doi:10.1016/j.bbmt.2008.03.005
7. Passweg, J. R., Baldomero, H., Bader, P., Bonini, C., Cesaro, S., Dreger, P, M. (2016, 02). Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: More than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplantation*, 51(6), 786-792. doi:10.1038/bmt.2016.20
8. Copelan, E. A. (2006, 04). Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 354(17), 1813-1826.

doi:10.1056/nejmra052638

9. Thomas, E. D. (2000, 09). Transplante De Medula Ossea: Uma Revisão Histórica. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, 33(3), 209.
doi:10.11606/issn.2176-7262.v33i3p209-218
10. Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ, et al: Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med* 34:1538-1543, 1949
11. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, et al: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12:197-201, 1951
12. Main JM, Prehn RT: Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 15:1023-1029, 1955
13. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, et al: Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 177:452-454, 1956
14. Billingham RE, Brent L: Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 242:477,1959
15. Epstein RB, Storb R, Ragde H, et al: CytotoxicS typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation* 6:4558, 1968
16. Lochte HL, Jr., Levy AS, Guenther DM, et al: Prevention of delayed foreign marrow reaction in lethally irradiated mice by early administration of methotrexate. *Nature* 196:11101111, 1962
17. Mannick JA, Lochte HL, Jr., Ashley CA, et al: Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* 15:255-266, 1960
18. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Cannon JH, et al: Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 38:1709-1716, 1959

19. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, et al: Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* ii:1366-1369, 1968
20. Martin, P. J. (n.d.). Overview of Hematopoietic Cell Transplantation Immunology. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*, 16-30.
21. Mickelson E, Petersdorf EW: Histocompatibility, in Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (eds): *Hematopoietic Cell Transplantation*, 2nd Edition. Boston, Blackwell Science, 1999, pp 28-37
22. Mattiuz, P. L., Ihde, D., Piazza, A., et al: New approaches to the population, genetic and segregation, analysis of the HL-A system. *Histocompatibility Testing*, 1970, pp 193 -205. Musnkgard, Copenhagen.
23. Thomas, E.D., Storb, R., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, F.L., Neiman, P.E., Lerner, K.G., Glucksberg, H. & Buckner, C.D. (1975) Bone-marrow transplantation. *New England Journal of Medicine*, 292, 832–843, 895–902.
24. Sinnott, P. J., Kippax, R. L., et al: A simple and rapid method for the detection of lymphocytotoxic antibodies using cell panels frozen on Terasaki plates. *Tissue Antigens*, v. 26, n. 5, p. 318- 22, Nov 1985.
25. Zachary, A. A. et al. Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplantation*, v. 60, n. 5, p. 498-503, Sep 15 1995.
26. Berah, M, Dausset, J. The use of the inverted microscope in leuco-agglutination. *Vox Sanguinis*, 1963, vol3. 371-5.
27. Howell, W. M. et al. A comparison of serological, cellular and DNA-RFLP methods for HLA matching in the selection of related bone marrow donors. *Bone Marrow Transplant*, v. 4, n. 1, p. 63-8, Jan 1989.
28. Moore, Breannan S. Ploeger, Nancy A.; DeGoey, Steven R. HLA antibody screening: comparison of a solid phase enzyme-linked immunoassay with antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity. *Clinical Transplantation*,

vol.64 issue 11 1617-1620

29. Mitsunaga, S., Ogawa, A., Tokunaga, K., Akaza, T., Tadokoro, K., & Juji, T. (1996, 04). A nested-PCR-RFLP method for high-resolution typing of HLA-B locus alleles. *Human Immunology*, 47(1-2), 42.
30. Olerup, O.; Zetterquist, H. DR "low-resolution" PCR-SSP typing--a correction and an up-date. *Tissue Antigens*, v. 41, n. 1, p. 55-6, Jan 1993.
31. Olerup, O.; Zetterquist, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, v. 39, n. 5, p. 225-35, May 1992.
32. Bunce, M.; TAYLOR, C. J.; WELSH, K. I. Rapid HLA-DQB typing by eight polymerase chain reaction amplifications with sequence-specific primers (PCR-SSP). *Hum Immunol*, v. 37, n. 4, p. 201-6, Aug 1993.
33. Middleton, D. et al. Frequency of HLA-B alleles in a Caucasoid population determined by a two-stage PCR-SSOP typing strategy. *Hum Immunol*, v. 61, n. 12, p. 1285-97, Dec 2000.
34. McGinnis, M. D. et al. Automated, solid-phase sequencing of DRB region genes using T7 sequencing chemistry and dye-labeled primers. *Tissue Antigens*, v. 46, n. 3, p. 173-179, 1995.
35. Kurz, B. et al. New high resolution typing strategy for HLA-A locus alleles based on dye terminator sequencing of haplotypic group-specific PCR-amplicons of exon 2 and exon 3. *Tissue Antigens*, v. 53, n. 1, p. 81-96, 1999.
36. National Marrow Donor program. <https://bethematch.org/>. Acessado em 24 de novembro de 2018
37. Registro brasileiro de doadores de medula óssea. <https://redome.inca.gov.br/>. Acessado em 24 de novembro de 2018.
38. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, et al. Allogeneic marrow stem-cell

- transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: A prospective study from the French society of bone marrow transplantation and cell therapy. *J Clin Oncol*. 2006;24(36):5695-5702. doi:10.1200/JCO.2006.08.0952
39. Saber W, Opie S, Rizzo JD, Zhang MJ, Horowitz MM, Schriber J. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2012;119(17):3908-3916. doi:10.1182/blood-2011-09-381699
40. Bouzas LFS. Análise da capacidade do REDOME/RENACORD em suprir as necessidades dos pacientes registrados no REREME. Biblioteca virtual em saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/luis_fernando_bouzasanalise_da_capacidade.pdf, 2011. Acessado em 24 de novembro de 2018.
41. Fabreti-Oliveira RA, Nascimento E, Fonseca CG, Santos MA. The heterogeneous HLA genetic composition of the Brazilian population and its relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens*. 2014;84(2):187-197. doi:10.1111/tan.12352
42. Little, A., Green, A., Harvey, J., Sage, D. (2016, 08). BSHI Guideline: HLA matching and donor selection for haematopoietic progenitor cell transplantation. *Int J Immunogenet International Journal of Immunogenetics*, 43(5), 263-286. doi:10.1111/iji.12282
43. Rubio, M. T., Savani, B. N., Labopin, M., Polge, E., Niederwieser, D., Ganser, A., Nagler, A. (2016, 08). The impact of HLA-matching on reduced intensity conditioning regimen unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in patients above 50 years—a report from the EBMT acute leukemia working party. *Journal of Hematology & Oncology J Hematol Oncol*, 9(1). doi:10.1186/s13045-016-0295-9
44. Bortin, M.M. & Saltzstein, E.C. (1969) Graft versus host inhibition: fetal liver

- and thymus cells to minimize secondary disease. *Science* (New York, N.Y.), 164, 316–318.
45. Reinherz, E.L., Geha, R., Rapoport, J.M., F.S. & Schlossman, S.F. (1982) Reconstitution after transplantation with T-lymphocyte-depleted HLA haplotype-mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 6047–6051.
46. Raiola, A. M., Dominiotto, A., Ghiso, A., Grazia, C. D., Lamparelli, T., Bacigalupo, A. (2013, 01). Unmanipulated Haploidentical Bone Marrow Transplantation and Posttransplantation Cyclophosphamide for Hematologic Malignancies after Myeloablative Conditioning. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 19(1), 117-122.
doi:10.1016/j.bbmt.2012.08.014
47. Berenbaum MC, Brown IN. Prolongation of homograft survival in mice with single doses of cyclophosphamide. *Nature*. 1963;200:84.
48. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):340-352.
49. Chakraverty R, Sykes M. The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood*. 2007; 110(1):9-17.
50. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H-P, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus- host disease and for chronic graft-versus- host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3214–9.
51. Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, van Bekkum DW, Gluckman E, Good RA, et al. Risk factors for chronic graft-versus- host disease after HLA- identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1990 Jun 15;75(12):2459–64.
52. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Flückiger U, Frère P, et

- al., Third European Conference on Infections in Leukemia. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-- 2009 update. *Bone Marrow Transplant*. 2011 May;46(5):709–18.
53. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. 2003;102(3):827-833. doi:10.1182/blood-2003-02-0456.
54. Bhat V. Cytomegalovirus infection in the bone marrow transplant patient. *World J Transplant*. 2015;5(4):287. doi:10.5500/wjt.v5.i4.287
55. Di Stasi A, Milton DR, Poon LM, et al. Similar transplantation outcomes for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with haploidentical versus 10/10 human leukocyte antigen-matched unrelated and related donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(12):1975-1981. doi:10.1016/j.bbmt.2014.08.013
56. Raiola AM, Dominiotto A, di Grazia C, et al. Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling grafts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(10):1573-1579. doi:10.1016/j.bbmt.2014.05.029
57. Gargiulo G, Orlando L, Alberani F, et al. Haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): A prospective observational study of incidence and management in HSCT centres within the GITMO network (Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo). *Eccancermedicalscience*. 2014;8(1):1-12. doi:10.3332/ecancer.2014.420
58. Amaral, SN. Incidência e caracterização de cistite hemorrágica em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Disponibilizado em 2015. Acessado em 26 de novembro de 2018.
59. Kumar S, DeLeve LD, Kamath PS, Tefferi A. Hepatic veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) after hematopoietic stem cell

- transplantation. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(5):589-598.
doi:10.4065/78.5.589
60. Arcese, W., Picardi, A., Santarone, S., Bartolomeo, P. D. (2015, 06). Haploidentical, G-CSF-primed, unmanipulated bone marrow transplantation for patients with high-risk hematological malignancies: An update. *Bone Marrow Transplant Bone Marrow Transplantation*, 50. doi:10.1038/bmt.2015.91
61. Fuchs, E. J. (2015, 06). HLA-haploidentical blood or marrow transplantation with high-dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant Bone Marrow Transplantation*, 50. doi:10.1038/bmt.2015.92
62. Kasamon, Y. L., Bolanos-Meade, J., Prince, Jones, R. J. (2015, 08). Outcomes of Nonmyeloablative HLA-Haploidentical Blood or Marrow Transplantation With High-Dose Post-Transplantation Cyclophosphamide in Older Adults. *Journal of Clinical Oncology*, 33(28), 3152-3161. doi:10.1200/jco.2014.60.4777
63. Gratwohl A. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(6):749-756. doi:10.1038/bmt.2011.110
64. Gyurkocza, B., & Sandmaier, B. M. (2014). Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*, blood-2014.

7. ARTIGO EM INGLÊS: Unrelated and Haploidentical hematopoietic stem cell transplants, single center, southern Brazil experience

Unrelated and Haploidentical donors hematopoietic stem cell transplants: a single center experience in southern Brazil

Mariana Monteiro Burin^{1,2}, Alessandra Aparecida Paz¹, Fernanda Fetter Scherer¹, Lisandra Della Costa Rigoni¹, Marina Ferri Pezzini³, Tahiane De Brum Soares^{1,2}, Lucia Silla^{1,4}

1. Hematology and Bone Marrow Transplant Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
2. Medical Science Postgraduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
3. Science in Gastroenterology Postgraduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
4. Department of Hematology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Mariana Monteiro Burin, Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Santa Cecilia, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brasil. [mmburin@hcpa.edu.br]

Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, in its various modalities, is a treatment with curative potential for a range of hematological or genetic diseases. Not all patients will have a 100% matched related donor available and will need an alternative graft source. Unrelated donor transplantations have

been done in most of those cases, but there are still patients that do not find a suitable match donor in the registers or do not have the time to wait for this search. In this scenario, transplantations using related haploidentical donors are gaining more relevance. This is a retrospective single Institution study that included all consecutive patients who underwent allogeneic stem cell transplantation, using a haploidentical related donor (HRD) or a volunteer unrelated donor, regardless of age and primary diseases, between January 2013 and June 2017. A total of 83 patients were included, 33,7% (28) were HRD transplants (HRDT), 66,3% (55) URD transplants (URDT). The two groups were similar, except the variable time from diagnosis to transplantation, HRDT, 14 months IQR (10-22), compared to URDT, 24 months IQR (18-51) ($p < 0,001$). There was no statistically significant difference for primary graft failure (HRDT 3,7% and URDT 1,9%), secondary graft failure (HRDT 7,1% and URDT 1,8%), median time to neutrophilic engraftment (HRDT 17 days, URDT 19 days) and complete chimerism on day 30 (HRDT 85,2% and URDT 82%). There were also no statistically significant differences in complications from transplant, such as hemorrhagic cystitis (HRDT 21,4% and URDT 9,1%), sinusoidal occlusive syndrome (HRDT 0% and URDT 3,6%), cytomegalovirus reactivations (HRDT 75% and URDT 53,7%) or invasive fungal infection (HRDT 50% and URDT 45,5%). Cumulative incidence of GVHD III and IV was 28,6% for HRDT and 20,4% for URDT. The cumulative incidence of chronic GVHD was 17,9% for HRDT and 14,8% for URDT. Relapsed disease occurrence was 10,7% in HRDT and 7,3% in URDT ($p=1$). Non-relapse mortality was 28,6% for HRDT and 40% for URDT ($p=0,319$). Overall survival was 57,1% for HRDT and 49,1% for URDT ($p=0,443$). Immune reconstitution was similar in both groups, except for median D+180 IgG, 644 (536 - 769) for HRDT and 507 (422 - 599) for URDT ($p=0,028$). In our center, haploidentical transplants results are comparable to unrelated transplants for patients with diverse malignant or benign disorders. To better access risk factors and complications in subgroups we need to increase the number of patients and follow-up.

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in its various modalities is a treatment with curative potential for a range of hematological diseases, either malignant or benign, and an increasing number of genetic diseases^{1,2}. The first-choice donor for the procedure is a completed matched sibling, but most patients will not have such a donor available. Alternative donors can be found in cord banks (with a cellularity limitation) and in volunteer donor register. More recently, after the publication of John Hopkins University technic of in vivo PostCy lymphocyte depletion³, related haploidentical donors have also become a feasible possibility of graft source.

The Brazilian Bone Marrow Donors Register (REDOME) is the third largest in the world, reaching over 4 million registrations in 2016. The chance of finding a donor is approximately 64%⁴. The majority of the registries are from a European ancestry population from the south and southeast Brazil, leaving a unrepresented population from north and northeast Brazil, most remarkably those with native American ancestry, that present a very unique HLA alleles⁵.

Haploidentical donor transplant came as a very promising alternative for developing countries with limited resources in the public health system and an ethnically diverse population. This retrospective study, including all patients submitted to HRDT PostCy in our center and comparing than to all patients that underwent URDT in the same period intends to evaluate the results of this procedures in a third world public health system reality.

Patients and methods

Patients

The study included all consecutive patients submitted to a haploidentical related donor (HRD) or a volunteer unrelated matched donor (URD - either 10/10 HLA allele matched or 9/10 HLA allele matched) allogeneic stem cell transplantation at our center, for the treatment of malignant or benign diseases, of all ages. Patients were included between January 2013 (when the first haploidentical transplant was done in the center) and June 2017 to allow minimal of 6 months of follow up; we also included patients undergoing a

second allogeneic stem cell transplantation, if they fulfil the previous specifications.

Endpoints

The primary endpoints were overall survival (OS), relapse free survival (RFS), non-relapse mortality (NRM), cumulative incidence of acute and chronic graft versus host disease (GVHD), cumulative incidence of cytomegalovirus reactivations, invasive fungal infection, sinusoidal occlusive syndrome (SOS) and hemorrhagic cystitis. We also evaluate immunologic reconstitution.

Definitions and Assessments

Relevant clinical data and laboratory tests were collected from medical records. Included underlying diseases were acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphoma, myelodysplastic syndrome, bone marrow aplasia, immunodeficiencies (severe combined immune deficiency, Hyper IgM Syndrome, LAD-1 deficiency, Chediak Higashi Syndrome, Wiskott Aldrich Syndrome), hemoglobinopathies and a ninth group encompassing other genetic disorders (adrenoleukodystrophy, mucopolysaccharidosis and osteopetrosis). Another analysis made in relation to the underlying pathology was the degree of the disease at the moment of the transplantation of stem cells, being considered initial disease for patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase and the patients with the other malignancies in the first remission; intermediate disease for patients with chronic myeloid leukemia in the accelerated phase or in second complete remission for the other malignancies and advanced disease for patients with chronic myeloid leukemia in blast crisis or in third remission or more for the other malignancies. Considering also the baseline disease, the time between disease and stem cell transplantation was calculated using the date of diagnosis of the neoplasm up to the date of stem cell infusion for malignancies and for bone marrow aplasia, and the date from birth to the date of stem cell infusion for genetic diseases (including immunodeficiencies and hemoglobinopathies), because of the difficulty in determining the timing of the diagnosis.

Neutrophil recovery was defined as achieving absolute neutrophil count $0.5 \times 10^9/L$ for 3 consecutive days. Complete chimerism was defined by 95% of donor CD3+ cells after transplantation by PCR analysis of variable nucleotide tandem repeats specific to the donor and recipient in bone marrow or peripheral blood samples enriched for CD3+ cells. Graft failure was defined as less than 5% donor CD3+ cells after transplantation not associated with relapse of disease. Secondary graft failure was defined by initial engraftment followed by subsequent loss of donor chimerism. Acute GVHD diagnosed and score were based on the modified Keystone criteria⁶ and chronic GVHD diagnosed was based on the National Institutes of Health consensus criteria⁷.

Data regarding the immune recovery of patients were also analyzed. Immunoglobulin G (IgG) dosages were collected from patients on days 30, 60 and 180 post-transplantation (before reposition). For D+30 and 60 were considered exams collected \pm 3 days difference from the exact day, for D+180, the tolerance was \pm 15 days. We also collected peripheral blood immunophenotyping data, with the same dates and criteria used for IgG, for the analysis of total lymphocytes, CD4 + cells, CD8 + cells, CD19 + cells and natural killers (NK) cells. Patients who did not present the test performed on the correct date, had the number of total lymphocytes taken from the blood count of the equivalent day, leaving the remaining data incomplete. Sepsis was defined according to The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock⁸. Cytomegalovirus monitoring through Polymerase Chain Reaction (PCR) and circulating antigen galactomannan were done weekly on the first 100 days for all patients and extended for those presenting GVHD requiring additional immunosuppression. Pre-emptive therapy for cytomegalovirus was initiated if viral reactivation was detected.

Non-relapse mortality was defined as death in continuous complete remission. Relapse was defined through PET-CT, morphologic, cytogenetics or flow cytometry criteria, according to primary disease, only 100 days after the transplant, patients with signs of disease before this date were considered refractory. The time of follow up was calculated from the date of the infusion of stem cells to the date of the last consultation recorded in the medical record or until the date of death of the patient.

Conditioning, GVHD regiments and Supportive Care

There were 10 different conditioning regiments used in total (as described in table 2). They were classified as myeloablative, reduced-intensity (RIC) and non myeloablative⁹. Some of the conditioning regiments included total body irradiation (TBI) and horse thymoglobulin (ATG).

All patients who underwent haploidentical transplantation had in vivo lymphocyte depletion, receiving cyclophosphamide 50mg/kg on day 3 after transplantation followed by tacrolimus and mycophenolate mofetil starting on day 5 after the transplant. Patients submitted to unrelated transplantation were given cyclosporine or tacrolimus, starting on day previous the transplant followed by methotrexate. Antimicrobial prophylaxis was administered according to institutional practice guidelines. Standard prophylaxis was started on hospital admission including fluconazole and acyclovir. Pneumocystis prophylaxis was started after neutrophilic engraftment using sulfamethoxazole trimethoprim or dapsone for allergic patients.

Statistical methods

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) to quantitative variables with normal distribution, or median (IQR) to without normal distribution. To compare characteristics from patients, primary disease and between the two different procedures, Chi square or Fisher Exact tests were used for categorical variables and Student's t or Mann-Whitney U for continuous variables. Estimates of Overall survival, progression free survival and non-relapse mortality were calculated using Kaplan-Meier. A p value < 0.05 was statistically significant. Statistical tests were performed using The Statistical Package for Social Science ver. 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

Results

A total of 83 patients were included, 33,7% (28) were HRD transplants (HRDT), 66,3% (55) URD transplants (URDT). Both groups were similar, as show in table 1. There was a great variation in age in both groups, ranging from 4 months to 56 years. The median age for HRDT and URDT were, respectively, 16,75 IQR (10 - 26) and 12,7 IQR (7,5 - 24,6). The percentage of patients that

have had a previous allogeneic transplant was similar in both groups, being of 7,1% in the HRDT and of 7,3% in the URDT.

Most patients that underwent transplantation had a malignant hematological disease (60,7% HRDT and 72,7% URDT), either classified as low risk (HRDT 7,2%, URDT 29,4%), intermediate risk (HRDT 70,6%, URDT 35,3%) or high risk (HRDT 23,5%, URDT 35,3%) ($p=0,041$). The only other variable between the groups with statistical significance ($p<0,001$) was the time from diagnosis to transplantation, which was lower to HRDT, 14 months IQR (10-22), compared to URDT, 24 months IQR (18-51).

Anti-human leucocyte antigen (anti-HLA) were positive in 25,9% of the haploidentical receptor, but desensitization was used only in one case. Father, mother and siblings were used as donors in the same proportion (32,1%), being the son, the donor, in only one case. The donor was a 10/10 high resolution match in 83,6% of the URDT. There were mismatches in A (7,3%), B (3,6%) and DQ (5,5%). The source of the graft was the bone marrow in 96,4% HRDT and in 89,1% of the URDT ($p=0,414$). The median CD34 dose was $4,6 \times 10^6$ cells/Kg IQR (2,3 - 6,23) in the HRDT and $3,55 \times 10^6$ cells/Kg IQR (2,5 - 5,1) in the URDT ($p=0,445$). Myeloablative conditioning was performed in 32,1% of HRDT and 45,5 of URDT. RIC was performed in 17,9% HRDT and 27,3 URDT. Non myeloablative conditioning represented 50% of HRDT and 27,3% of URDT. The most used conditioning for HRDT was the standard John Hopkins University protocol (cyclophosphamide, fludarabine, TBI 2GY). On the other hand, busulfan + cyclophosphamide in myeloablative doses was the most common conditioning regiment for URDT (see table 2).

Primary graft failure occurred in only two patients, one in the HRDT group (3,7%) and the other in the URDT (1,9%). Secondary graft failure occurred in 3 patients, 2 from HRDT group (7,1%) and one from URDT (1,8%) ($p=0,262$). There was no significant difference in time to neutrophilic graft. Median days for neutrophilic graft was 17 IQR (15 - 20) for HRDT and 19 IQR (16 - 24) for URDT ($p=0,086$). On day 30 after the transplantation, 85,2% of HRDT and of 82% URDT shown complete chimerism. The median days of hospitalization were 51 IQR (39 - 71) for HRDT and 48 IQR (40 - 60) for URDT

($p=0,622$). There were also no statistically significant differences in complications from transplant, as shown in table 4. Hemorrhagic cystitis occurred in 21.4% HRDT and 9,1% URDT. Sinusoidal occlusive syndrome (SOS) was present in only 2 patients (3,6%), both URDT. Cytomegalovirus reactivations were very common in both groups, corresponding to 75% of HRDT and 53.7% of URDT. The median number of reactivations was 1 for both groups but IQR (1-2) for HRDT and IQR (0-2) for URDT ($p=0,059$).

Sepsis occurred in 49,2% and 52,7% for HRDT and URDT respectively in any given moment of the follow up. The event occurred in the first 100 days following the transplant in 75% of the HRDT cases and in 86.2% of the URDT. There was no statistical difference in the incidence of sepsis or the moment of its occurrence ($p=0,584$).

Invasive fungal infection was present during the transplantation, in the first 100 days and/or in later periods of the follow up in 50% of HRDT and in 45,5% of URDT. Most of those infections occurred in the first 100 days, 64,2% for HRDT and 88% for URDT. All patients that were in treatment for fungal infection at the time of the transplant (8 in total), presented with a new invasive fungal infection during the follow up period. The most common agent was aspergillosis, responsible for 71,4% and 76% of the infections in HRDT and URDT respectively, follow by candidemia 7,1% in HRDT and 20,8% in URDT and fusariosis in 21,4% HRDT. There were also cases of mucormycosis and convallaria.

The cumulative incidence of GVHD I e II was 42,9% for HRDT and 44,4% for URDT. Cumulative incidence of GVHD III and IV was 28,6% for HRDT and 20,4% for URDT. The cumulative incidence of chronic GVHD was 17,9% for HRDT and 14,8% for URDT. There was no statistical significance difference for any of those variables. There was no statistically significant difference in the parameters used to measure immune reconstitution (as seen on figure1), except for the measure of IgG made 180 days pos transplant. Median IgG from D+180 was 644 (536 - 769) for HRDT and 507 (422 - 599) for URDT ($p=0,028$). There was no difference in the measurement in D+30 and D+60 and in the results of total lymphocytes, CD4 cells, CD8 cells, CD19 cells

and NK cells (figure 4). Disease Relapsed occurrence was 10,7% in HRDT and 7,3% in URDT ($p=1$). There was one case of refractory disease in the URDT group. Non-relapse mortality was 28,6% for HRDT and 40% for URDT ($p=0,319$).

Overall survival was 51,8% for all patients, 57,1% for HRDT and 49,1% for URDT ($p=0,443$) as seen on figure 1. There was significant difference in OS for patients that underwent transplantation for benign conditions (OS 80,8%), comparing to those with malignancies (OS 38,6%) ($p=0,001$). None the less, there was no difference in OS when adjusted for benign primary disease and modality of transplant. Benign disease that underwent HRDT OS was 72,2% and URDT 86,7. Malignant disease that underwent HRDT OS was 47,1% and URDT was 35% ($p=0,363$). The main cause of death was infection, corresponding to 57,5% of the deaths in HRDT and 57,1% in URDT. Relapsed disease was the second cause, 25% HRDT and 20% URDT. GVRD was the cause in 16,7% of HRDT and 14,3% URDT. Other causes represented 12,5%, all in the URDT group. Mean time of follow up was 417,54 days.

Discussion

We reported the outcomes of a retrospective single center cohort of patients who underwent hematopoietic stem cell transplantation, as treatment for a different number of conditions, receiving grafts from alternative donors, either HRD or URD. The two groups were well balanced for pretransplantation characteristics, being the only significant difference the time from diagnosis to transplant favoring HRDT and a higher number of patients presenting intermediate risk disease in the HRDT group. To do the small number of patients, a stratification of the analyses of the subgroups was not indicated. Comparing the outcomes, there was also no significant difference in OS, NRM, acute GVHD, chronic GVHD, relapses, graft failure or incidence of infections between the groups. The only disparity was the higher D+180 IgG in HRD transplants.

Although HRD transplants were considered experimental in our institution when the data for this study started to be collected, and was used as

a last resource, it still confirmed it's potential as rapid available option^{10,11}. The choice for time to transplantation using the initial date of malignant disease diagnosis or the date of birth for genetic disease makes comparison to other studies more difficult. Nonetheless, this method was employed considering the difficulties in the Brazilian public health system to access treatments and exams. This leads to patients having diagnostic delays and being submitted to alternative treatments before being referred to a stem cell transplantation center. Furthermore, even after the patient is ready to undergo transplantation, there is still a waiting list due to the lack of available beds; all those factors can influence results and more so if we determined time to transplantation from the date of first SCT center visit to the date of the transplant.

Some studies have shown a delay in HRDT neutrophilic engraftment when compared to URDT¹²⁻¹⁵ what was not seen in our patients; the likely cause for that is that we do not use colony stimulator factor after most unrelated transplants as we did for the haploidentical protocol. Primary graft failure had a very low occurrence in both groups, result also seen in other publications^{12,15,16}. The incidence of secondary graft failure was similar to the results found in literature as well¹². The three secondary graft failures that occurred in the HRDT happened in patients with genetics and/or immunodeficient syndromes (mucopolysaccharidoses, chediaki igashi, LAD-1 deficient) that underwent transplantation later than the ideal age recommended for the procedure and receive non myeloablative conditioning regimens, which might have contributed to the graft failure. One of those patients, was on their second allogenic transplantation, having already lost previous graft.

The tendency for a higher incidence in hemorrhagic cystitis in HRDT transplant reported in literature^{17,18} was also seen in our data, and as suggested elsewhere it could be related to TBI. The cumulative incidence of cytomegalovirus reactivations was also similar to what has been reported in previous studies, with no statistically significant difference between the groups¹². Although in some of those studies the tendency for more infections in HRDT was present as well, this factor could also have influence in the higher incidences of hemorrhagic cystitis reported^{14,17}.

We had a higher cumulative incidence of Invasive fungal infection, in both groups, than what was reported by other investigators¹⁷. This complication is probably related to the late and advanced condition that patients come to undergo transplantation and to the lack of proper medication available for treatment and prophylaxis pre and postransplantation. This complication might have contributed to a higher NRM rate. The cumulative incidence of grade III and IV GVHD was similar to what was previously reported by other investigators^{12,16}. We had a lower cumulative incidence of chronic GVHD than was reported by other investigators in both groups^{12,14–16,19,20} even when adjusted for a reduced follow up. This might be related to the fact that the majority of our stem cell source was bone marrow as opposed to peripheral blood stem cells routinely utilized in North American centers. We also had no difference in cumulative incidence in any form of GVHD between the groups, what was reported in other publications^{12,15,17,19,21}.

Relapses in this study were similar between HRDT and URDT, differing than what is reported in the literature, and also lower than in other studies^{12,14–16,19,21}. As relapses in HRDT are attributed to a non-myeloablative conditioning, this was probably not seen in our data because most high-risk patients received more intense conditioning, even in the HRDT group. On the other hand, this intensification, associated with the delay to perform the transplants and the restriction to access treatments imposed by Brazilian public health system reality might have contributed to a higher NRM than reported by other studies^{12,15,19,21}. This hypothesis is endorsed by the fact that the most common cause of death in our study was infection, followed by relapsed and GVHD, in disagreement with most reports^{16–19,21,22}. We also have to acknowledge that some publications have a longer follow up period, and thought most relapses were precocious; we could be missing data from later relapses.

OS was similar as reported^{12,17–22} We consider, nevertheless, that there are ponderations to be made concerning this result. Even though there was also great delay in transplanting benign pathologies, this group had a significant better result, and most other published articles consisted only of malignant disease, making this comparison even more difficult. On the other hand, our malignant disease risk assessment might have been underestimated when

comparing to other studies that applied the Dana Faber risk classification²³. We did not use this tool due to the large number of missing information regarding molecular and genetic analyses in our registers, but when applied to the patients with enough data, there was a great prevalence of high risk and very high-risk in our population. The days of hospitalization during the transplant are higher than in other related articles because of the necessity to admit the patient for the whole procedure (including conditioning and treatment of most of complications) due to the lack of out-patient structure available in the Brazilian public system. Immune reconstitution can be assessed by many parameters. What is most important to emphasize is that there was no difference in the cumulative incidence of any infection (sepsis, viral, fungal) or GVHD despite the statistically significant difference in D+180 IgG. There are many publications evaluating immune reconstitution in haploidentical transplants, but very little information regarding IgG and most of them are from Asian authors that performed haploidentical stem cell transplantations, using post ATG. The data available for pos cyclophosphamide HRDT and URDT is mostly focused on NK, CD3+, CD4+ and B lymphocytes recovery in early stages, for specific pathologies, and our results were in accordance with its findings^{14,17,24–26}. Different aspects, other than graft source, contributes to immune reconstitution (conditioning, GVHD occurrence, prophylaxis and treatment), there is still discussion as to HRDT having an equal, faster or delayed immune reconstitution comparing to URDT and its's impact in the incidence of infections^{17,27,28}.

Our study has several limitations. The reduce number of patients and the diversity of the characteristics limits clear cut conclusions for the role of haploidentical transplantation as a feasible option in developing countries also for patients with benign or rare disease are necessary. Additionally, the immune reconstitution in haploidentical transplantations and its implications, especially after 100 days pos transplantations, still can be better evaluated in future investigations.

References

1. Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, et al. Hematopoietic stem cell

- transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(6):778-785. doi:10.1038/bmt.2016.18
2. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: More than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(6):786-792. doi:10.1038/bmt.2016.20
 3. Luznik L, O'Donnell P V., Symons HJ, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(6):641-650. doi:10.1016/j.bbmt.2008.03.005
 4. No Title. redome.inca.gov.br/.
 5. Fabreti-Oliveira RA, Nascimento E, Fonseca CG, Santos MA. The heterogeneous HLA genetic composition of the Brazilian population and its relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens.* 2014;84(2):187-197. doi:10.1111/tan.12352
 6. Przepiorka D, Weisdorf D MP. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1994;(15):825-828.
 7. Lee SJ, Wolff D, Kitko C, et al. Measuring Therapeutic Response in Chronic Graft-versus-Host Disease. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. The 2014 Response Criteria Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(6):984-999. doi:10.1016/j.bbmt.2015.02.025
 8. Mervyn Singer, MD, FRCP; Clifford S. Deutschman, MD, MS; Christopher Warren Seymour, MD, MSc; Manu Shankar-Hari, MSc, MD F, Djillali Annane, MD, PhD; Michael Bauer, MD; Rinaldo Bellomo, MD; Gordon R. Bernard, MD; Jean-Daniel Chiche, MD P, Craig M. Coopersmith, MD; Richard S. Hotchkiss, MD; Mitchell M. Levy, MD; John C. Marshall, MD;

- Greg S. Martin, MD Ms, Steven M. Opal, MD; Gordon D. Rubenfeld, MD, MS; Tom van der Poll, MD, PhD; Jean-Louis Vincent, MD, PhD; Derek C. Angus, MD M. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *J Am Med Assoc.* 2016;315(8):762-775.
9. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: One size does not fit all. *Blood.* 2014;124(3):344-353. doi:10.1182/blood-2014-02-514778
 10. Fuchs EJ. Related haploidentical donors are a better choice than matched unrelated donors: Point. *Blood Adv.* 2017;1(6):397-400. doi:10.1182/bloodadvances.2016002188
 11. Bashey A, Solomon SR. T-cell replete haploidentical donor transplantation using post-transplant CY: An emerging standard-of-care option for patients who lack an HLA-identical sibling donor. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(8):999-1008. doi:10.1038/bmt.2014.62
 12. Baker M, Wang H, Rowley SD, et al. Comparative Outcomes after Haploidentical or Unrelated Donor Bone Marrow or Blood Stem Cell Transplantation in Adult Patients with Hematological Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016. doi:10.1016/j.bbmt.2016.08.003
 13. Castagna L, Crocchiolo R, Furst S, et al. Bone Marrow Compared with Peripheral Blood Stem Cells for Haploidentical Transplantation with a Nonmyeloablative Conditioning Regimen and Post-transplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014. doi:10.1016/j.bbmt.2014.02.001
 14. Di Stasi A, Milton DR, Poon LM, et al. Similar transplantation outcomes for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with haploidentical versus 10/10 human leukocyte antigen-matched unrelated and related donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(12):1975-1981. doi:10.1016/j.bbmt.2014.08.013
 15. Bashey A, Zhang X, Jackson K, et al. Comparison of Outcomes of Hematopoietic Cell Transplants from T-Replete Haploidentical Donors

- Using Post-Transplantation Cyclophosphamide with 10 of 10 HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 Allele-Matched Unrelated Donors and HLA-Identical Sibling Donors: A Mul. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(1):125-133. doi:10.1016/j.bbmt.2015.09.002
16. Solomon SR, Sizemore CA, Sanacore M, et al. Total Body Irradiation-Based Myeloablative Haploidentical Stem Cell Transplantation Is a Safe and Effective Alternative to Unrelated Donor Transplantation in Patients Without Matched Sibling Donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(7):1299-1307. doi:10.1016/j.bbmt.2015.03.003
 17. Raiola AM, Dominiotto A, di Grazia C, et al. Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling grafts. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(10):1573-1579. doi:10.1016/j.bbmt.2014.05.029
 18. Solomon SR, Sizemore CA, Sanacore M, et al. Haploidentical Transplantation Using T Cell Replete Peripheral Blood Stem Cells and Myeloablative Conditioning in Patients with High-Risk Hematologic Malignancies Who Lack Conventional Donors is Well Tolerated and Produces Excellent Relapse-Free Survival: *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(12):1859-1866. doi:10.1016/j.bbmt.2012.06.019
 19. Ciurea SO, Zhang MJ, Bacigalupo AA, et al. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood.* 2015;126(8):1033-1040. doi:10.1182/blood-2015-04-639831
 20. Burroughs LM, Donnell PVO, Sandmaier BM, et al. Comparison of Outcomes of HLA-Matched Related, Unrelated, or HLA-Haploidentical Related Hematopoietic Cell Transplantation following Nonmyeloablative Conditioning for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;14(11):1279-1287. doi:10.1016/j.bbmt.2008.08.014.Comparison
 21. Kanate AS, Mussetti A, Kharfan-Dabaja MA, et al. Reduced-intensity transplantation for lymphomas using haploidentical related donors vs

- HLA-matched unrelated donors. *Blood*. 2016;127(7):938-947.
doi:10.1182/blood-2015-09-671834
22. D'Souza A FC. Current Uses and Outcomes of Hematopoietic Cell Transplantation (HCT): CIBMTR Summary Slides. <http://www.cibmtr.org>. Published 2017.
23. Philippe Armand, Haesook T. Kim, Brent R. Logan, Zhiwei Wang, Edwin P. Alyea MEK, Richard T. Maziarz, Joseph H. Antin, 1 Robert J. Soiffer, Daniel J. Weisdorf, J. Douglas Rizzo MMH, Saber and W. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2016;123(23):3664-3671.
24. Alida Dominietto, Anna Maria Raiola, Barbara Bruno, Maria Teresa van Lint, Francesco Frassoni, Carmen Di Grazia, Francesca Gualandi, Stefania Bregante, Riccardo Varaldo AG and AB. Rapid Immune Reconstitution Following Unmanipulated Haploidentical BMT with Post-Transplant High Dose Cyclophosphamide. *Blood*. 2011;118(21):3050. <http://www.bloodjournal.org/content/118/21/3050?sso-checked=true>.
25. Isabel Gonzalez-Gascon y Marin, Ana María Pérez-Corral, Jorge Gayoso, Javier Anguita, Ana Carolina Franco, Cristina Pascual, Mi Kwon, David Serrano, Pascual Balsalobre, Ismael Buno, Carolina Martínez-Laperche ES and JLD-M. Early and Favourable Immune Reconstitution After Unmanipulated Haploidentical Stem Cell Transplantation With High Dose Post-Transplant Cyclophosphamide Regardless Intensity Of Conditioning Regimen. *Blood*. 2013;122(21):4620. <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/4620>.
26. Pérez-Martínez A, González-Vicent M, Valentín J, et al. Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(11):1419-1427. doi:10.1038/bmt.2012.43
27. Atilla E, Atilla PA, Bozdağ SC, Demirer T. A review of infectious complications after haploidentical hematopoietic stem cell transplantations. *Infection*. 2017;45(4):403-411. doi:10.1007/s15010-017-

1016-1

28. Reisner Y, Aversa F, Martelli MF. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: State of art. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(S2):S1-S5. doi:10.1038/bmt.2015.86

Table 1 – Patients Characteristics

Variables	BMT n=83	HRDT n=28	URDT n=55	<i>P</i>
Age (years)*	13 (8-25)	17 (10-26)	13 (8-25)	0.455
Gender				
Male	53 (63.9%)	18 (64.3%)	35 (63.6%)	1.000
Disease				
Malignant	57 (68.7%)	17 (60.7%)	40 (72.7%)	0.387
Benign	26(31.3)	11(39.3%)	15 (27.3%)	
ALL	24 (28.9%)	6 (21.4%)	18 (32.7%)	
AML	14 (16.9%)	7 (25%)	7 (12.7%)	
MS	10 (12%)	1 (3.6%)	9 (16.4%)	
Lymphoma	4 (4.8%)	2 (7.1%)	2 (3.6%)	
CML	5 (6.0%)	1 (3.7%)	4 (7.3%)	0.120
Aplasia	11 (13.3%)	7 (25%)	4 (7.3%)	
Immunodeficiency	10 (12%)	4(14.3%)	6 (10.9%)	
Hemoglobinopathy	1 (1.2%)	0 (0%)	1 (1.8%)	
Metabolic Disease	4 (4.8%)	0 (0%)	4 (7.3%)	
Disease Status				
Initial	11 (21.6%)	1 (5.9%)	10 (29.4%)	
Intermediary	24 (47.1%)	12 (70.6%)	12 (35.3%)	0.041
Advanced	16 (31.4%)	4 (23.5%)	12 (35.3%)	
Time until transplant (months)*	21.50 (13-38.75)	14 (10-22)	24 (18-51)	<0.001
Previous BMT	6 (7.2%)	2 (7.1%)	4 (7.3%)	1.000

Abbreviations: ALL, acute lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; MS, myelodysplastic syndrome; CML, chronic myeloid leukemia; bone marrow transplant (BMT).

Median (IQR)*

Table 2 – Conditioning Regiments

Conditioning	BMT	HRDT	URDT
	n=83	n=28	n=55
Myeloablative	34 (30,9%)	9 (32.1%)	25 (45.5%)
BuCy	20 (24.1%)	0	20 (36.4%)
Flu + TBI	9 (10.8%)	8 (28.5%)	1 (1.8%)
Etoposide + TBI	2 (2.4%)	0	2 (3.6%)
Thiothepa + Bucy	1 (1.2%)	1 (3.6%)	0
BuMel	2 (2.4%)	0	2 (3.6%)
RIC	20 (24.1%)	5 (17.9%)	15 (27.3%)
BuFlu	10 (12%)	3 (10.8%)	7 (12.1%)
FluMel	7 (8.4%)	2 (7.1%)	5 (9.1%)
FluCy+ATG	3 (3.61%)	0	3 (5.4%)
Non myeloablative	29 (35%)	14 (50%)	15 (27.3%)
Cy+Flu+TBI	14 (16.9%)	14 (50%)	0
Cy + TBI +ATG	15 (18.1%)	0	15 (27.3%)

Abbreviations: RIC, reduced-intensity; Flu, fludarabine; TBI, total body irradiation; Bu, busulfan; Mel, melphalan; Cy, cyclophosphamide; ATG, horse thymoglobulin.

Table 3 – Graft Characteristics

Variables	BMT	HRDT	URDT	P
	n=83	n=28	n=55	
DSA +	7 (25.9%)	7 (25.9%)	0 (0%)	
Mismatch				
A	4 (7.3%)	0 (0%)	4 (7.3%)	
B	2 (3.6%)	0 (0%)	2 (3.6%)	
DQ	3 (5.5%)	0 (0%)	3 (5.5%)	
Bone marrow	76 (91.6%)	27 (96.4%)	49 (89.1%)	0.414
Peripheral steam cells	7 (8.4%)	1 (3.6%)	6 (10.9%)	
Myeloablative	34 (41%)	9 (32.1%)	25 (45.5%)	0.121
Non myeloablative	29 (34.9%)	14 (50%)	15 (27.3%)	

RIC	20 (24.1%)	5 (17.9%)	15 (27.3%)	
Primary graft failure	2 (2.5%)	1 (3.7%)	1 (1.9%)	1.000
Complete chimerism D+30	64(83.1%)	23 (85.2%)	41 (82%)	0,970
Secondary graft failure	3 (3.6%)	2 (7.1%)	1(1.9%)	0,262
Days for Grafting*	18 (15-22)	17 (15-20)	19 (16-24)	0.070
Hospitalization Days*	48.50 (40-62)	51 (39-71)	48 (40-60)	0.622

Abbreviations: Donor specific antibody (DSA); reduced-intensity (RIC);
Median (IQR)*

Table 4 – Transplant Complications

Variables	BMT	HRDT	URDT	P
	n=28	n=28	n=55	
Hemorrhagic cystitis	11 (13.3%)	6 (21.4%)	5 (9.1%)	0.221
SOS	2 (2.4%)	0 (0%)	2 (3.6%)	0.547
CMV reactivation	50 (60.2%)	21 (75%)	29 (52.7%)	0.085
Sepsis	41 (49.4%)	12 (49.2%)	29 (52.7%)	
First 100 days	34 (82.9%)	9 (75%)	25 (86.2%)	0.584
After 100 days	8 (19.5%)	3 (25%)	15 (17.2%)	
Fungal infection	39(47%)	14 (50%)	25 (45.5%)	
Pretransplantation	5 (12.8%)	4 (28,5.3%)	1 (4%)	
First 100 days	31 (79.6%)	9 (64.2%)	22 (88%)	0.108
After 100 days	7 (18%)	4 (21.4%)	4 (16%)	
Acute GVHD I and II	36 (43.9%)	12 (42.9.%)	24 (44.4%)	0.942
Acute GVHD III and IV	19 (23.2%)	8 (28.6%)	11 (20.4%)	0.686
Chronic GVHD	13 (15.9%)	5 (17.9%)	8 (14.8%)	0.969
Relapse	7 (8.4%)	3 (10.7%)	4 (7.3%)	0.683
TRM	30 (36.1%)	8 (28,6%)	22 (40%)	0.319
Causes of death				
Infection	23 (57.5%)	7 (58.3%)	16 (57.1%)	
Relapse	6 (15%)	3 (25%)	3 (10.7%)	0.420
GVHD	6 (15%)	2 (16.7%)	4 (14.3%)	
Others	5 (12.5%)	0	5 (17.9%)	

Abbreviations: SOS, sinusoidal occlusive syndrome; CMV, cytomegalovirus; GVHD, graft versus host disease, TRM, transplant related mortality.

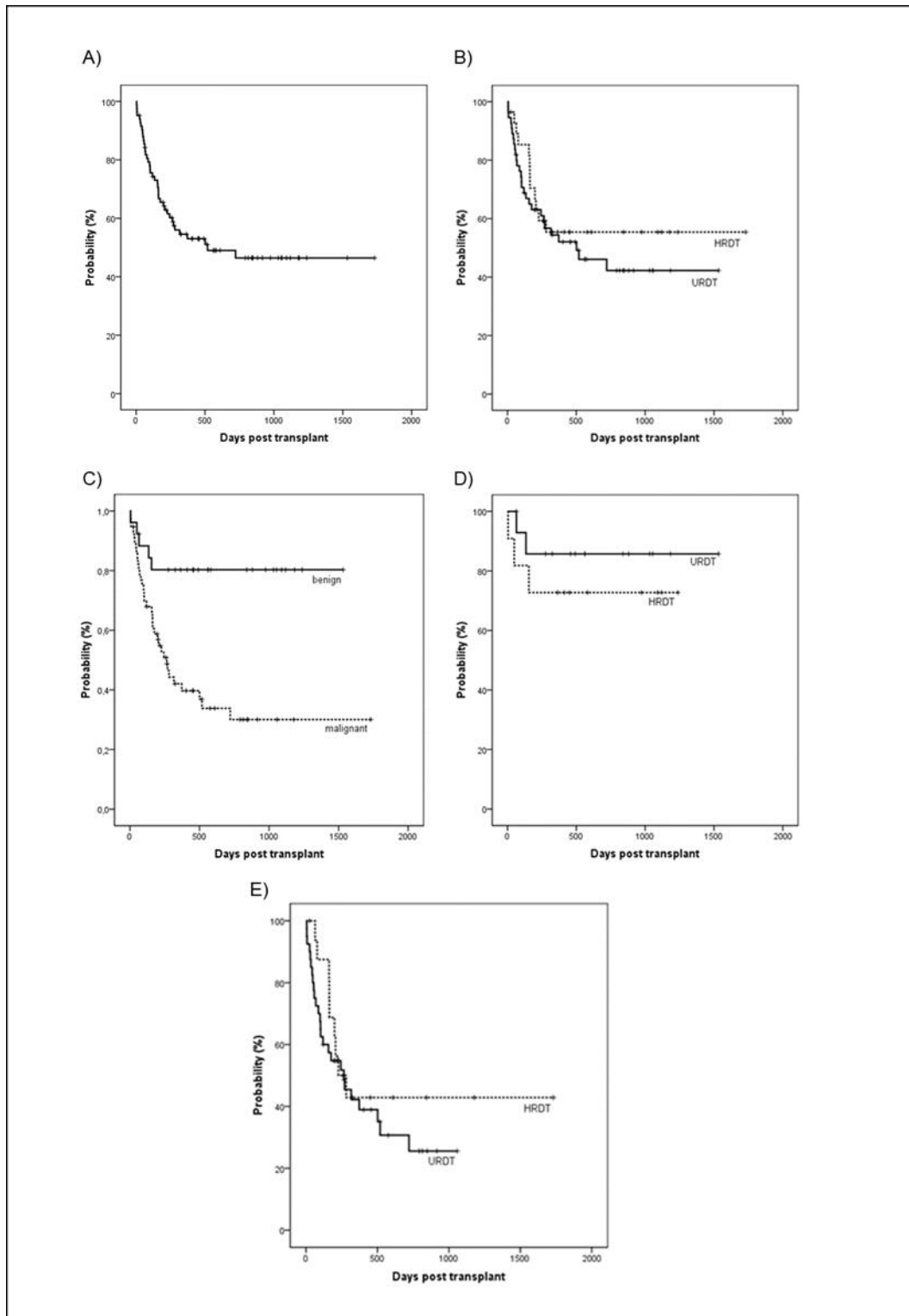


Figure 1 - Kaplan-Meier analyses of overall survival (A) all patients, (B) haploidentical related donor transplant (HRDT), unrelated donor transplants (URDT), (C) patients with benign and malignant diseases, (D) patients with benign disease, haploidentical related donor transplant (HRDT) and unrelated

donor transplants, (E) patients with malignant disease, haploidentical related donor transplant (HRDT) and unrelated donor transplants.

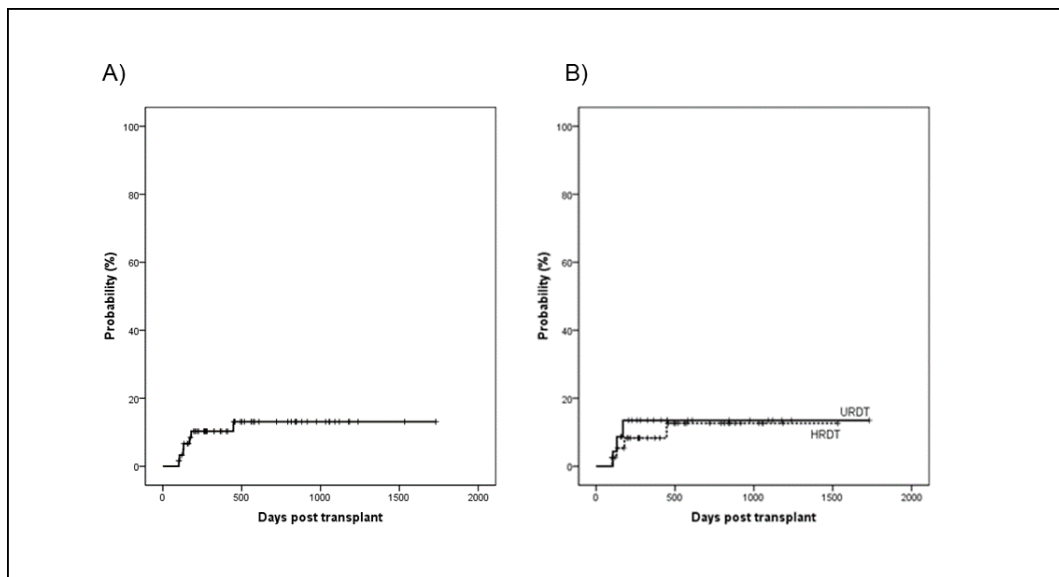


Figure 2 - Kaplan-Meier analyses for relapse (A) all patients, (B) haploidentical related donor transplant (HRDT), unrelated donor transplants (URDT).

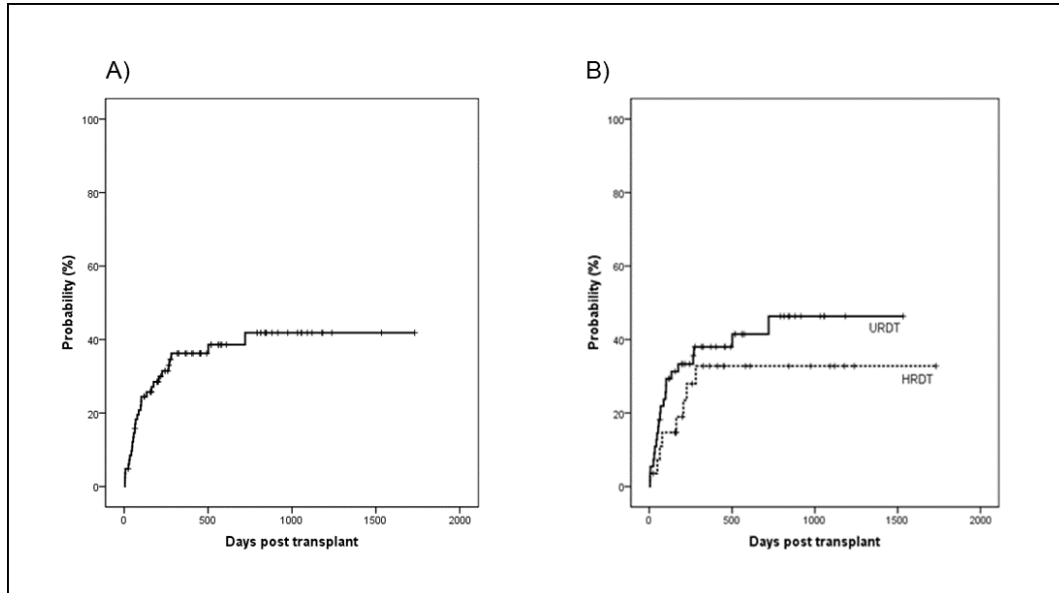


Figure 3 - Kaplan-Meier analyses for transplant related mortality (A) all patients, (B) haploidentical related donor transplant (HRDT), unrelated donor transplants (URDT).

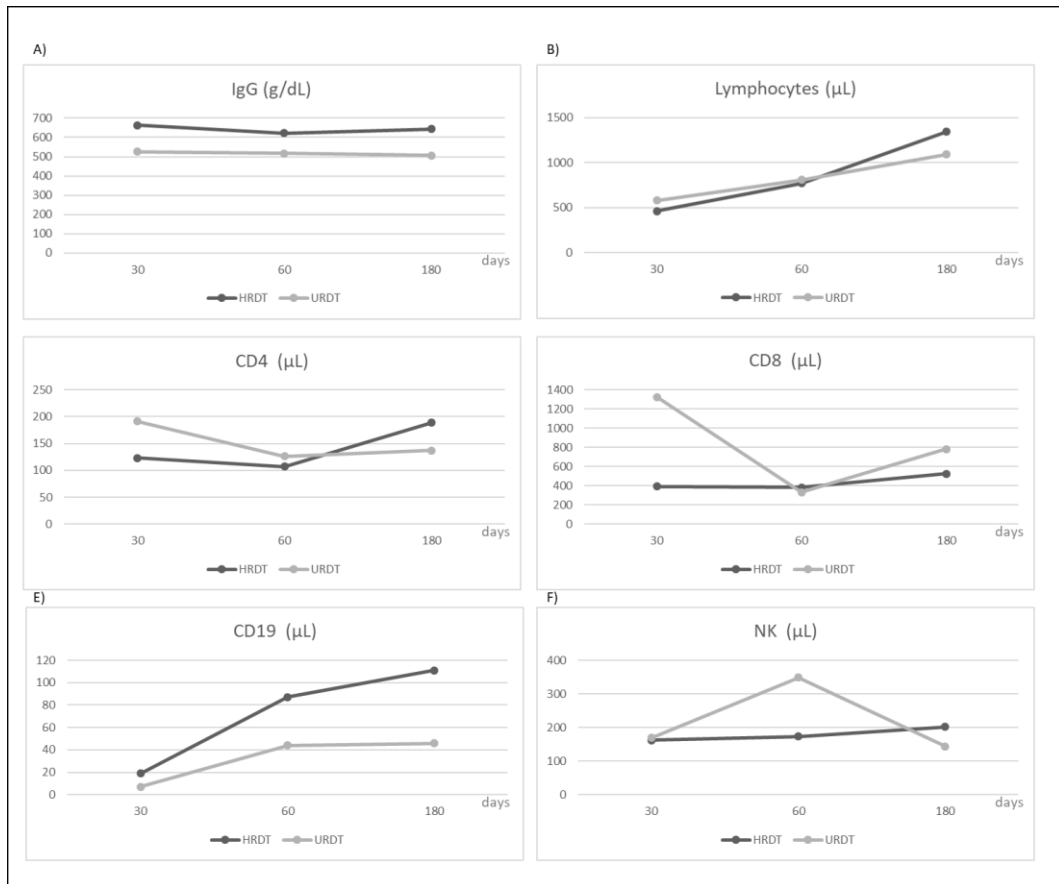


Figure 4 – Immune reconstitution analyses. (A) IgG, (B) Lymphocytes, (C) CD4+ cells, (D) CD8+ cells, (E) CD19+ cells, (F) natural killers cells.