



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

GISELLA KARINA AGUILAR VILLA

Avaliação da recuperação imunológica pós-transplante de células tronco hematopoéticas nas modalidades HLA-idêntico e haploidêntico e sua consequência nas infecções e reativações virais

Orientadora: Prof. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Rocio Hassan

RIO DE JANEIRO

2019



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

GISELLA KARINA AGUILAR VILLA

Avaliação da recuperação imunológica pós-transplante de células tronco hematopoéticas nas modalidades HLA-idêntico e haploidêntico e sua consequência nas infecções e reativações virais

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Prof. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Rocio Hassan

RIO DE JANEIRO
2019

**FICHA CATALOGRÁFICA SERÁ ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INCA
PARA A VERSÃO FINAL DA TESE**

(A ser impressa no verso da primeira folha de rosto)

**INDICAR APENAS AS PALAVRAS-CHAVE NA VERSÃO APRESENTADA PARA
A DEFESA PÚBLICA DA TESE**

Palavras-chave: 1. Recuperação Imunológica; 2. Transplante de células tronco hematopoéticas; 3. Haploidêntico; 4. Reativações virais.



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

AUTOR: GISELLA KARINA AGUILAR VILLA

Avaliação da recuperação imunológica pós-transplante de células tronco hematopoéticas nas modalidades HLA-idêntico e haploidêntico e sua consequência nas infecções e reativações virais

Orientadora: Prof. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Orientadora: Prof. Dra. Claudia Rocio Hassan

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Martin Bonamino - Presidente

Prof. Dr. Elias Hallack Atta

Prof. Dr. André Mencialha

Prof. Dra. Tereza de Souza Fernandez – Suplente Interno

Prof. Dr. Marcelo Land – Suplente Externo

RIO DE JANEIRO

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo a meu amado Deus que faz tudo possível, a meu amado esposo Mauricio, a minha família e todos os pacientes que precisam de um Transplante de Células tronco hematopoéticas.

AGRADECIMENTOS

A meu amado Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que ele me destina. À Deus pela minha existência, pelo amor incondicional, pela saúde, força e capacidade que me dá todos os dias para seguir em frente tomando o controle das nossas vidas.

Ao meu amado esposo Mauricio por sempre acreditar em mim, me levantar os dias não tão bons e me lembrar que tudo é possível se estamos juntos da mão de Deus.

Aos meus pais Mogollita e Chito. “Obrigada” nunca irá corresponder minha gratidão por todo o esforço que vocês fazem por nós. Por fazer de mim uma mulher de bem com um coração sensível cheio da presença de Deus.

Aos meus irmãos: Mauro, Gordana, Marranito, Chanty, Peluquitash, Flaquito, David e Julian por acreditar em mim, ser meu apoio incondicional e meu polo a terra. Vocês são meus exemplos e minha base, aqueles que sempre estarão comigo. “Obrigada”, a minha maior benção é fazer parte desta maravilhosa família.

À minha melhor amiga Panda: obrigada pelo teu amor incondicional, pela amizade, pela torcida e apoio.

Agradeço à Prof. Dra. Eliana Abdelhay pela orientação, confiança, paciência e oportunidade de trabalhar nesta linha de pesquisa. Admiro-o muito pelo empenho na formação de pesquisadores e sua história no CEMO. A verdade nem sei expressar em palavras o agradecimento por ter acreditado em mim (lembro a primeira vez que a gente se encontrou eu nem falava direito português). Obrigada pela oportunidade.

Agradeço à Prof. Dra. Rocio Hassan pela orientação, oportunidade, atenção e disponibilização do seu tempo, pelo valioso auxílio na construção e na correção deste trabalho. Admiro muito sua franqueza e seu interesse na formação de pesquisadores, você é uma pesquisadora incrível. Muito obrigada.

À minha família da imunologia, meninas vocês são o presente mais lindo e especial que Deus me deu no Brasil. Bernadete, Virginia, Mayara, Claudia, Vânia, Mércia e

Karen sem o apoio, amor e compressão de vocês, não seria possível. Obrigada por cada abraço que precisei, por cada oração para mim e minha família, obrigada por me ensinar sempre com um sorriso a citometria de fluxo. A verdade nem sei expressar em palavras o agradecimento que eu tenho. Sempre vou levar a todas vocês no meu coração.

Ao Programa de Pós-graduação de Oncologia do INCA, pelos professores e pela qualidade de formação que é oferecida.

À equipe de enfermagem da Unidade de Transplante de Medula Óssea CEMO do INCA, pela atenção, dedicação, paciência e presteza na coleta das amostras dos pacientes.

Especial agradecimento aos pacientes submetidos ao transplante, pais, doadores de medula óssea e grupo controle, pois sem vocês este trabalho não poderia ser realizado.

EPÍGRAFE

“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer e triunfar. Enquanto há vida, há esperança”.

Stephen Hawking



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Avaliação da recuperação imunológica pós-transplante de células tronco hematopoéticas nas modalidades HLA-idêntico e haploidêntico e sua consequência nas infecções e reativações virais

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gisela Karina Aguilar Villa

No transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) haploidêntico é característica uma intensa alorreatividade bidirecional e um retardo na reconstituição imunológica (RI), tendo como consequência um aumento de infecções oportunistas e reativações de vírus latentes. Estudos comparativos sobre a recuperação imunológica e o acometimento de infecções virais entre as modalidades de TCTH alogênico HLA-idêntico e haploidêntico ainda são escassos. Portanto neste trabalho o objetivo foi avaliar a recuperação imunológica dos pacientes submetidos ao TCTH haploidêntico comparado ao transplante HLA-idêntico e verificar como este processo influencia nos eventos de infecções e reativações virais. Amostras de sangue periférico de 31 pacientes submetidos ao TCTH foram analisadas 8 dias (D-8) antes do TCTH e no D+30, D+60, D+90, D+120 e D+180 pós-TCTH pela técnica de imunofenotipagem multiparamétrica. As infecções virais (HSV1/2, VZV, CMV, EBV, HHV-6 e -7, adenovírus e BKV) foram diagnosticadas por PCR multiplex e qPCR em tempo real a partir de DNA extraído do plasma. A análise estatística foi realizada através do software Prism GraphPad. Dos 31 ptes, 7 (22%) receberam TCTH aparentado (Ap), 12 (39%) não-aparentados (Nap) e 12 (39%) um TCTH haploidêntico(haplo). Do grupo HLA-idêntico, 5 (26,31%) desenvolveram DECHa e 4 foram a óbito (21%). Do grupo haplo (menor follow-up), 3 (25%) desenvolveram DECHa e 4 (33%) foram óbito devido a infecção viral. Em relação à RI as células NK foram as primeiras a recuperar, seguida pelos linfócitos T citotóxicos CD8+, linfócitos B CD19+ e finalmente os linfócitos T auxiliares CD4+ tanto no transplante HLA-idêntico como HLA-haplo. Infecções virais diferiram no grupo Ap, onde o CMV foi detectado com cargas baixas em 5/7 pacientes (71,4%), todas as reativações foram resolvidas. No grupo não-aparentado (NAP), houve 18 eventos em 9/12 pts (75%), 10 reativações de CMV (83,3%) entre D+30 e D+120; 2 EBV (16%) (D+60), 2 HHV-6 e 4 BKV. No grupo haplo, 91,6% dos pacientes sofreram infecção/reativação herpesviral, sendo 61% CMV, 5,5% HHV-6 e 5,5% adenovírus, 5,5% VZV e 22,2% BKV. Níveis baixos de linfócitos T CD4+ com expressão do co-ativador CD28, assim como os linfócitos T CD4+CD45RO+ estiveram associados a um aumento do risco da reativação do CMV ao longo dos acompanhamentos. Valores de linfócitos T CD4+CD28+ < 112 (média) no D+30 foram associados a maior risco de reativação do CMV ao longo do acompanhamento (83,3% vs 28,6% para os casos com altos níveis de células T CD4+CD28+; (p= 0,014).



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Avaliação da recuperação imunológica pós-transplante de células tronco hematopoéticas nas modalidades HLA-idêntico e haploidêntico e sua consequência nas infecções e reativações virais

Evaluation of post-transplant immunological recovery of hematopoietic stem cells between haploidentical and HLA-identical modalities and their consequences in viral infections and reactivations

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gisela Karina Aguilar Villa

In haploidentical HSCT, intense bidirectional alloreactivity and a delay in immunological reconstitution are normally found, resulting in an increase in opportunistic infections and reactivation of latent viruses. Comparative studies on the immune recovery and the involvement of viral infections between allogenic HLA-identical and haploidentical HSCT modalities are still scarce. To evaluate the immunological recovery of patients submitted to haploidentical HSCT compared to HLA-identical HSCT and to verify how this process influences the events of viral infections and reactivations. Peripheral blood samples from 27 patients submitted to HSCT were analyzed 8 days (D-8) before HSCT and at D+30, D+60, D+90 and D+120 post-HSCT by multiparametric immunophenotyping. Viral infections (HSV1 / 2, VZV, CMV, EBV, HHV-6 and -7, adenovirus and BKV) were diagnosed by multiplex PCR and qPCR in real time from DNA extracted from plasma. Statistical analysis was performed using Prism GraphPad software. Of the 31 pts, 7 (22%) received related HSCT (R), 12 (39%) unrelated (NR) and 12 (39%) had a haploidentical HSCT. Of the HLA-identical group, 5 (26.31%) developed GVHD and 4 died (21%). Of the haploidentical group (lower follow-up), 3 (25%) developed GVHD and 4 (33%) died due to viral infection. Regarding IR, NK cells were the first to recover, followed by CD8 + cytotoxic T lymphocytes, CD19 + B lymphocytes and finally CD4 + helper T lymphocytes in both HLA-identical and HLA-haplo HSCT. Viral infections differed in the R group, where CMV was detected with low loads in 5/7 patients (71.4%), all reactivations were resolved. In the non-related group (NR), there were 18 events in 9/12 pts (75%), 10 CMV reactivations (83.3%) between D+30 and D+120; 2 EBV (16%) (D + 60), 2 HHV-6 and 4 BKV. In the haplo group, 91.6% of the patients suffered herpesviral infection / reactivation, being 61% CMV, 5.5% HHV-6 and 5.5% adenovirus, 5.5% VZV and 22.2% BKV. Low levels of CD4 + T lymphocytes with CD28 co-activator expression, as well as CD4 + CD45RO + T lymphocytes were associated with an increased risk of CMV reactivation throughout the follow-up. CD4 + CD28 + T-lymphocyte values (mean) in D+30 were associated with a higher risk of CMV reactivation during follow-up (83.3% vs 28.6% for cases with high levels of CD4 + CD28 +; (p = 0.014).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema da hematopoese.	1
Figura 1.2: Principais etapas de desenvolvimento do transplante de células-tronco no mundo.	5
Figura 1.3: Cromossomo 6 humano e a estrutura do HLA classes I e II	8
Figura 1.4: Fases das infecções em receptores de transplante alogênico.....	24
Figura 4.1: Dot plots ilustrativos das diferentes subpopulações celulares encontradas no sangue periférico.....	33
Figura 5.1: Classificação dos casos estudados por tipo de TCTH.	35
Figura 5.2: Reconstituição de granulócitos pós-TCTH alogênico.....	39
Figura 5.3: Reconstituição de monócitos pós-TCTH alogênico.....	40
Figura 5.4: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos totais no D+30 nas três modalidades de transplante.	41
Figura 5.5: Reconstituição de linfócitos totais pós-TCTH alogênico.....	42
Figura 5.6: Proporção linfócito/monócito nos TCTH alogênicos.....	43
Figura 5.7: Reconstituição de células NK totais pós-TCTH alogênico.	45
Figura 5.8: Reconstituição das células NK ativadas pós-TCTH alogênico.....	46
Figura 5.9: Reconstituição de células NKT pós-TCTH alogênico.....	47
Figura 5.10: Comparação dos valores absolutos de células NKT no D+60 nas três modalidades de transplante.	48
Figura 5.11: Reconstituição de linfócitos T pós-TCTH alogênico.....	49
Figura 5.12: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T totais CD3+ no D+90 nas três modalidades de transplante aparentado (AP), não aparentado (NAP) e haploidêntico (HAPLO).....	50
Figura 5.13: Reconstituição T citotóxicos CD8+ pós-TCTH alogênico.....	51
Figura 5.14: Reconstituição de Linfócitos CD8+ TCRαβ+ pós-TCTH alogênico.	52
Figura 5.15: Reconstituição de Linfócitos T citotóxicos CD8+TCRγδ+ pós- TCTH alogênico.....	54
Figura 5.16: Reconstituição de Linfócitos T helper CD4+ pós-TCTH alogênico.....	55
Figura 5.17: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T helper CD3+/CD4+.	56

Figura 5.18: Reconstituição de linfócitos T citotóxicos CD4+/TCR $\alpha\beta$ + pós-TCTH alogênico.....	57
Figura 5.19: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T CD4+/TCRab+.....	58
Figura 5.20: Relação CD4/CD8 no pós-TCTH alogênico.	59
Figura 5.21: Reconstituição de linfócitos T helper de memória CD45RO+/CD4+ pós-TCTH alogênico.	60
Figura 5.22: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T <i>helper</i> de memória CD45RO+/CD4+.	61
Figura 5.23: Reconstituição de linfócitos T helper efetores CD45RA+/CD4+ pós-TCTH alogênico.	62
Figura 5.24: Reconstituição de linfócitos T citotóxicos efetores CD45RA+/CD8+ pós-TCTH alogênico	63
Figura 5.25: Reconstituição de linfócitos T citotóxicos efetores CD45RA+/CD8+ pós-TCTH.....	64
Figura 5.26: Comparação dos valores absolutos e percentuais dos linfócitos T citotóxicos efetores CD45RA+CD8+ no pré-transplante nas três modalidades de transplante aparentado AP, não aparentado NAP e haploidêntico.	65
Figura 5.27: Relação CD45RA+CD8+/CD45RO+CD8+ no pós-TCTH alogênico.	65
Figura 5.28: Reconstituição de linfócitos T CD8+/CD28+ e linfócitos T CD4+/CD28+ pós-TCTH alogênico.	67
Figura 5.29: Reconstituição de linfócitos B CD19+ pós-TCTH alogênico.....	68
Figura 5.30: Detecção de infecções e reativações virais ao longo do acompanhamento pós-TCTH.	70
Figura 5.31: Gráficos de boxplot representando a variação das quantificações de subpopulações CD4+ no D+30 pós TCTH, de acordo com a reativação viral em qualquer ponto do acompanhamento pós-transplante.	71
Figura 5.32: Gráficos de boxplot representando a variação das quantificações de subpopulações CD4+ no D+30 após-TCTH. de acordo com a reativação do CMV em qualquer ponto do acompanhamento pós-transplante.	71
Figura 5.33: Gráficos de boxplot representando a variação das quantificações de subpopulações CD4+ após transplante, de acordo com a reativação viral no D+30 e D+180 no acompanhamento pós-transplante.	72
Figura 5.34: Gráficos de boxplot representando a variação das quantificações de subpopulações CD4+ após transplante, de acordo com a reativação do CMV no D+180 no acompanhamento do transplante.	73
Figura 5.35: Probabilidade acumulativa de sobrevida global em pacientes submetidos a TCTH diferenciado em transplante AP, NAP e HAPLO.	74

Figura 5.36: Probabilidade acumulativa de sobrevida global de acordo com a detecção da reativação viral em qualquer tempo no pós-transplante.	74
Figura 5.37: Probabilidade acumulativa de sobrevida global em pacientes submetidos TCTH, de acordo com os níveis de linfócitos T CD8+ categorizados pela média do grupo no D+30	75
Figura 5.38: Probabilidade acumulativa de sobrevida global em pacientes submetidos TCTH.	76
Figura 5.39: Probabilidade acumulativa de sobrevida global em pacientes submetidos TCTH com valores células NK categorizadas de acordo com a média do grupo no D+30.	76
Figura 5.40: Probabilidade acumulativa de reativação viral do CMV ao longo do tempo pós-transplante.....	77
Figura 5.41: Probabilidade acumulativa de reativação viral ao longo do tempo pós-transplante, de acordo com PLM > ou < 0,70 no D+30.....	77
Figura 5.42: Probabilidade acumulativa de reativação do CMV ao longo do tempo pós-transplante com valores de linfócitos T CD4+	78
Figura 5.43: Probabilidade acumulativa de reativação do CMV e reativação viral ao longo do tempo pós-transplante categorizados. Probabilidade acumulativa de reativação do CMV e reativação viral ao longo do tempo pós-transplante categorizados.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Vantagens e desvantagens dos TCTH autólogos e alogênicos	7
Tabela 1.2: Estadiamento da DECH aguda	21
Tabela 4.1: Anticorpos utilizados no estudo de recuperação imunológica e suas marcações.....	32
Tabela 5.1: Características dos pacientes e transplantes	36
Tabela 5.2: Valores de referência das populações celulares do sangue periférico em doadores saudáveis (grupo controle)	39
Tabela 5.3: Perfil das reativações virais nas diferentes modalidades de transplante	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ags	Antígenos
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
ATG	Globulina anti-timocítica
BKV	Poliomavírus BK
Bu/Cy	Bussulfano / Ciclofosfamida
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CMV	Citomegalovírus
CPMP	Células Progenitoras Multipotentes
CTH	Célula Tronco Hematopoética
CTH-LT	Células Tronco Hematopoéticas de longo-termo
CTH-ST	Células Tronco Hematopoéticas de curto-termo
Cy/TBI	Ciclofosfamida / Irradiação corporal total
DECH	Doença do Enxerto Contra Hospedeiro
DECHa	Doença do Enxerto Contra Hospedeiro aguda
DECHc	Doença do Enxerto Contra Hospedeiro crônica
DLI	Infusão de Linfócitos do Doador
DLPT	Doença Linfoproliferativa
EBV	Epstein-Barr Vírus
EDTA	Ácido Etilenodiamino Treta-Acético
GVL	Efeito do Enxerto Contra Leucemia
CMV	Citomegalovírus humano
HHV-6	Herpes Humano tipo 6
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
KIR	Receptores de Células NK
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMO	Microambiente da Medula Óssea
MO	Medula Óssea
MTX	Metotrexato
NK	Células Natural <i>Killers</i>
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
PEM	Progenitor Eritroide e Megacariócito
PGM	Progenitor de Granulócitos e Macrófagos
PL	Progenitor Linfoide

PM	Progenitor Mieloide
PLM	Proporção de linfócitos e monócitos
POP	Procedimento Operacional Padrão
PRO-B	Progenitor de Células B
PRO-CD	Progenitor de Células Dendríticas
PRO-LT	Progenitor de Linfócitos T
PRO-NK	Progenitor de Células natural killer
PT-Cy	Ciclofosfamida pós-transplante
QT	Quimioterapia
REDOME	Registro Nacional de Doador de Medula Óssea
REROME	Registro Nacional dos Receptores de Medula Óssea
RIC	Condicionamento de Intensidade Reduzida
RT	Radioterapia
SCUP	Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
SP	Sangue Periférico
SPM	Sangue Periférico Mobilizado
TBI	Irradiação Corporal Total
TCHT	Transplante de células tronco hematopoéticas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptores de Linfócitos T
TCTH-haplo	Transplante de Células Tronco Hematopoéticas haploidêntico.
TGI	Trato gastrointestinal
TMO	Transplante de Medula Óssea
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VRS	Vírus Respiratório Sincicial
VZV	Vírus Varicella-Zoster

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A Célula Tronco Hematopoética e o processo de hematopoese.....	1
1.2 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas.....	2
1.2.1 Contexto histórico geral.....	2
1.2.1.1 O Transplante de Células Tronco hematopoéticas no Brasil.....	5
1.2.2 Aspectos gerais do Transplante de Células Tronco Hematopoéticas	6
1.2.2.1 O sistema HLA no transplante.....	7
1.2.2.2 Sistema HLA e escolha do doador no alo-TCTH.....	9
1.2.3 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas alogênico aparentado e não aparentado	11
1.2.4 Desenvolvimentos clínicos e terapêuticos no TCTH-haploidêmico	11
1.2.4.1 Regimes de Condicionamento	13
1.2.4.2 Reconstituição imunológica após o TCTH alogênico	14
1.2.5 Efeitos imunológicos e complicações pós-Transplante de Células Tronco Hematopoéticas	19
1.2.5.1 Efeito enxerto versus leucemia no TCTH alogênico.....	19
1.2.5.2 Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH)	20
1.2.5.2.1 Profilaxia para DECH	21
1.2.5.3 Infecções no pós-TCTH.....	22
1.2.5.3.1 Principais herpesvírus associados com infecção sistêmica do paciente transplantado.....	25
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 Pacientes e amostras	30
4.2 Obtenção dos dados clínicos dos pacientes	30
4.3 Coleta de sangue periférico.....	31
4.3.1 Processamento de células	31
4.4 Estudo imunofenotípico por citometria de fluxo.....	32
4.4.1 Análises imunofenotípicas.....	29
4.5 Avaliação das infecções e reativações virais	33
4.7 Análise estatística	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Caracterização do grupo de estudo	36
5.2 Reconstituição Imunológica.....	37

5.3 Cinética de reconstituição dos Granulócitos.....	38
5.4 Cinética de reconstituição dos Monócitos	39
5.5 Cinética da reconstituição de linfócitos totais	40
5.6 Relação entre Linfócitos e Monócitos.....	42
5.7 Reconstituição de linfócitos NK, T e B	43
5.8 Reconstituição de células NK.....	44
5.9 Reconstituição de células NKT.....	46
5.10 Reconstituição de Linfócitos T.....	48
5.11 Reconstituição das populações citotóxicas CD8+ de linhagem $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$	52
5.12 Reconstituição das populações linfocitárias CD4+ de linhagem $\alpha\beta$	56
5.13 Relação linfócitos T helper CD4+/ linfócitos T citotóxicos CD8+	58
5.14 Reconstituição de linfócitos T efetores e de memória	59
5.15 Relação entre linfócitos T CD8+ de memória e efetores	65
5.16 Reconstituição de linfócitos T com expressão de co-estimuladores	66
5.17 Reconstituição de linfócitos B.....	67
5.18 Infecções virais.....	69
5.19 Análise de Sobrevida global e risco de reativação viral	73
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES.....	80
8 REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Célula Tronco Hematopoética e o processo de hematopoese

A Célula Tronco Hematopoética (CTH) é definida como células que possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação celular. Além disso, são capazes de gerar células altamente especializadas, dando origem as linhagens hematopoéticas, num processo denominado hematopoese (COPELAN, 2006).

As Células Tronco Hematopoéticas (CTHs) são classificadas em duas subpopulações: Célula Tronco Hematopoética de Longo-Termo (CTH-LT), do inglês *Long-Term Hematopoietic Stem Cell*, e a Célula Tronco Hematopoética de Curto Termo (CTH-ST), do inglês *Short-Term Hematopoietic Stem Cell* (SMITH, WEISSMAN, HEIMFELD, 1991; UCHIDA, 1992; MORRISON; WEISSMAN, 1994; OSAWA *et al.*, 1996).

A CTH-LT é responsável pela manutenção da população hematopoética mais indiferenciada. Essas células, geralmente, estão na fase G0 do ciclo celular, de forma que se mantêm relativamente constantes e presentes ao longo de toda a vida, sofrendo poucos ciclos de divisões mitóticas (WEISSMAN, 2000).

A CTH-ST origina-se de divisões celulares assimétricas da CTH-LT, com potencial maior de proliferação e comprometimento para gerar os precursores das diferentes linhagens sanguíneas, as chamadas Células Progenitoras Multipotente (CPMP), do inglês, "*Multi-Potent Progenitors*". As CPMP dão origem a uma ou mais linhagens hematopoéticas, linfoide e mieloide (WANG, 2011; WEISSMAN, 2000).

A diferenciação linfoide dá origem as células T, B e NK (*Natural Killers cells*) que executam respostas imunes adaptativas e inatas; a diferenciação mieloide inclui distintas células de vida-curta como granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e basófilos), monócitos (que se diferenciam em macrófagos), células dendríticas, eritrócitos (hemácias) e megacariócitos (plaquetas) (DOULATOV *et al.*, 2012). A Figura 1.1 demonstra o processo de hematopoese.

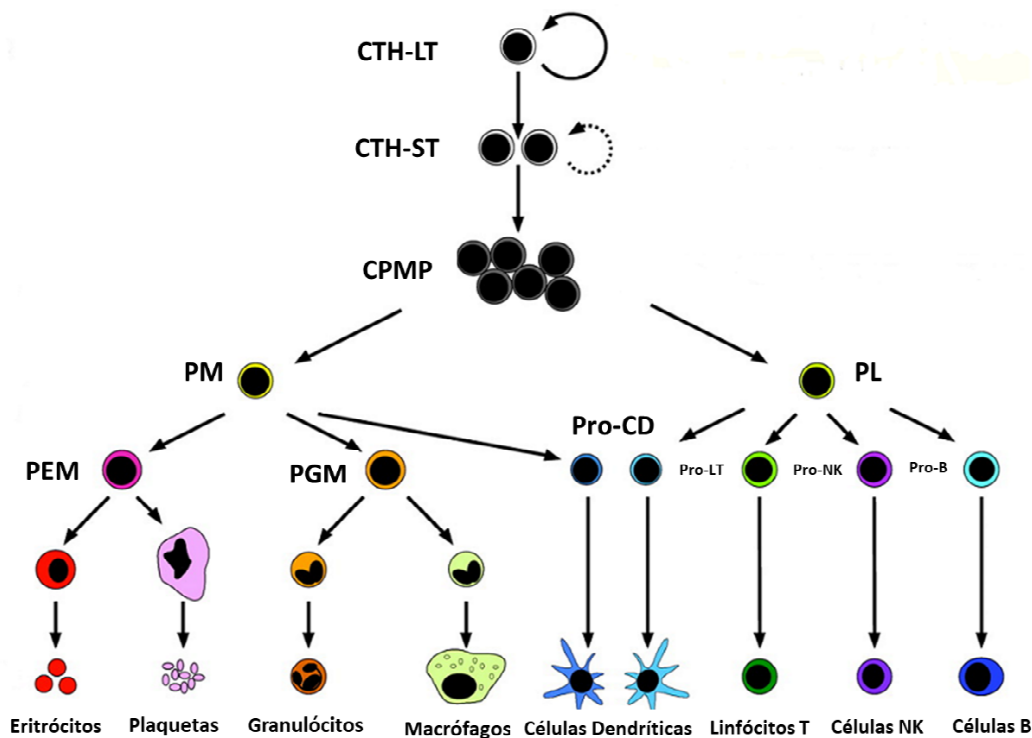


Figura 1.1: Esquema da hematopoese. Uma CTH-LT dá origem à CTH-ST, que dá origem as CPMP com comprometimento para as linhagens hematopoéticas, seguido da maturação celular linfoide e mieloide, resultando nas diversas populações celulares maduras tais como: linfócitos T e B, eritrócitos (hemácias), megacariócitos (plaquetas), basófilos, mastócitos, eosinófilos, neutrófilo e monócito (macrófago). Legenda: CTH-LT = Célula Tronco Hematopoética “Long Term”, CTH-ST = Célula Tronco Hematopoética “Short Term”, CPMP = Células Progenitoras Multipotentes, PM = Progenitor mieloide, PL = Progenitor linfoide, PEM = Progenitor Eritroide e Megacariócito, PGM = Progenitor de Granulócitos e Macrófagos, Pro-CD = Progenitores de Células Dendríticas, Pro-LT = progenitor de linfócitos T, Pro-NK = progenitor de células Natural Killer, Pro-B = Progenitor de células B. Fonte: Adaptado de *Passagué et al., 2003*

Um desequilíbrio em qualquer uma das etapas da hematopoese pode resultar em desordens hematológicas as quais podem ser tratadas a partir de uma reconstituição imunológica através do Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (APPELBAUM *et al.*, 2009; SPITZER *et al.*, 2012).

1.2 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas

1.2.1 Contexto histórico geral

O Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH) é um procedimento terapêutico que vem sendo utilizado como tratamento de doenças hematológicas e autoimunes, dentre outras (APPELBAUM *et al.*, 2009).

O TCTH teve seu desenvolvimento ao longo das últimas sete décadas. Os trabalhos pioneiros de Medawar, Billingham e Brent permitiram visualizar a potencialidade terapêutica do transplante de órgãos e tecidos (GIBSON; MEDAWAR, 1943; BILLIGHAM; BRENT, 1959; COLARES, 2013). Em 1950,

conseguiram caracterizar vários antígenos que geneticamente seriam responsáveis pela rejeição tanto de tecidos alogênicos normais como tumorais (SNELL, 1986; COLARES, 2013).

Apesar desses importantes estudos, foi durante a Segunda Guerra Mundial (1945) em paralelo com o projeto Manhattan que se obteve o marco improvável do TCTH, ou chamado à época de Transplante de Medula Óssea (TMO). Isso só foi possível através dos estudos sobre o efeito da radiação, aos quais Jacob *et al* (1949) descreveram que a proteção do baço de um camundongo permitia a vida do animal após a radiação letal (THOMAS, 1999; COLARES, 2013).

Lorenz *et al*, (1951) descreveram efeito protetor similar através da infusão tanto de células esplênicas quanto as células da Medula Óssea (MO). Esse efeito foi atribuído inicialmente a um hormônio que estimulava a recuperação de células na MO. No entanto, uma revisão de Barnes e Luit (1954) demonstrou que esse efeito poderia ser mediado por células (WELNIAK; BLAZAR; MURPHY, 2007; COLARES, 2013).

Dados definitivos em apoio à teoria da reconstituição celular vieram dos estudos de Richmond Prehn e Joan Main, que em 1955 demonstraram que camundongos que tinham sido protegidos contra a radiação letal por uma infusão de MO aceitavam um enxerto de pele do doador dessa medula (MAIN; PREHN, 1955). Mas apesar desses estudos, somente em 1956 com o estudo de Ford *et al* (1956) foi possível embasar o conceito celular através dos achados citogenéticos ao provar que camundongos letalmente irradiados passavam a ter características do doador de MO no compartimento hematopoético (COLARES, 2013).

Em 1956, foi realizado o tratamento da leucemia murina por irradiação e enxerto da MO. Também foram publicados estudos envolvendo seres humanos com Irradiação Corporal Total (TBI), do inglês *Total Body Irradiation*, ou Quimioterapia (QT) seguido do resgate hematopoético por infusão de MO (THOMAS *et al*, 1957). Em humanos, o único transplante com sucesso foi realizado em um paciente com leucemia terminal a quem se infundiu MO de um doador gêmeo idêntico (transplante singeneico) (THOMAS *et al*, 1959; COLARES, 2013).

Concomitantemente, começaram a ser observados os efeitos pós TCTH, os quais, as primeiras evidências da Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) foram descritas através de estudos experimentais que provaram que após a “pega” do enxerto, o sistema imune poderia montar um ataque contra o hospedeiro, o que

inicialmente ficou conhecido como síndrome da caquexia ou doença secundária (SIMONESEN, 1957).

A partir desses achados foi possível correlacionar a rejeição mediada pela DECH com o grau de histocompatibilidade através do sistema HLA em humanos descoberto por Dausset e van Rood (GROTH, 2000; COLARES, 2013). Dessa forma, o desenvolvimento pré-clínico e clínico do transplante foram adiados até que métodos relativamente confiáveis de tipagem do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) e avaliação de histocompatibilidade estivessem disponíveis. Além disso, o desenvolvimento de novos fármacos para prevenção da DECH, como o metotrexato também foram realizados (COLARES, 2013).

No período entre 1960-1967 foram realizados inúmeros transplantes de MO em humanos principalmente como um tratamento para a Anemia Aplástica Severa e leucemias. No entanto, somente na década de 70 foi possível concluir que os transplantes não foram bem-sucedidos, após uma avaliação de 200 tentativas de enxerto de medula alogênicos. Muito se questionou sobre a veracidade da histocompatibilidade e da dosagem da irradiação utilizada (THOMAS, 1999; COLARES, 2013).

Paralelamente, muitos estudos foram realizados na década de 60 sobre as barreiras genéticas no transplante. Foram descobertos os principais *loci* de histocompatibilidade e que os mesmos se encontravam ligados no braço curto do cromossoma 6 e, que, a incompatibilidade em *loci* específicos é a principal responsável pela barreira de histocompatibilidade no transplante hematopoético (CONGDON, 1971). O período entre 1968-1975 marcou o retorno do transplante alogênico baseado nos avanços da tipagem HLA e das tecnologias de transfusão de componentes sanguíneos, assim como no desenvolvimento de melhores antibióticos e quimioterápicos (COLARES, 2013).

Entre 1976-1986 ocorreu a expansão dos centros transplantadores pelo mundo, iniciado em *Seattle*. A demonstração que o transplante poderia ser utilizado como tratamento de leucemias fortaleceu essa modalidade terapêutica. Em 1979, por exemplo, foram relatados os primeiros transplantes de MO em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA), demonstrando a melhora na sobrevida dos mesmos e avanços do transplante para pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC) (COLARES, 2013).

Concomitantemente, foram relatadas a cura da Talassemia Major e a doença falciforme através do emprego do TCTH. (THOMAS *et al*, 1982; JOHNSON *et al.*,

1984; LUCARELLI *et al*, 1984). Além disso, foi evidenciado que a depleção de células T poderia diminuir a incidência de DECH (PRENTICE *et al*, 1984) embora a manipulação dessas influenciasses no efeito do enxerto contra a leucemia (GVL do inglês *graft-versus-leukemia*) resultando em uma maior taxa de recaída (BRENNER; HESLOP, 1991; HO; SOIFFER, 2001). Além disso, foram estabelecidas estratégias farmacológicas de profilaxia da DECH, como a utilização de metotrexato (MTX) e Ciclosporina A (POWLES *et al.*, 1978; STORB *et al*, 1986). Entre 1986-2010 foram desenvolvidas novas terapias para profilaxia de complicações bacterianas e virais, além da padronização de regimes de condicionamento mieloablativos e não mieloablativos além de avanços e da criação de banco de doadores não aparentados e organização de redes internacionais de cooperação na busca de doadores compatíveis (COLARES, 2013). A figura 1.2 demonstra os principais fatos históricos no contexto do TCTH no período de 1955 – 2010, mostrando as conquistas científicas e tecnológicas que permitiram avanços nos resultados e na aplicação dos TCTH.

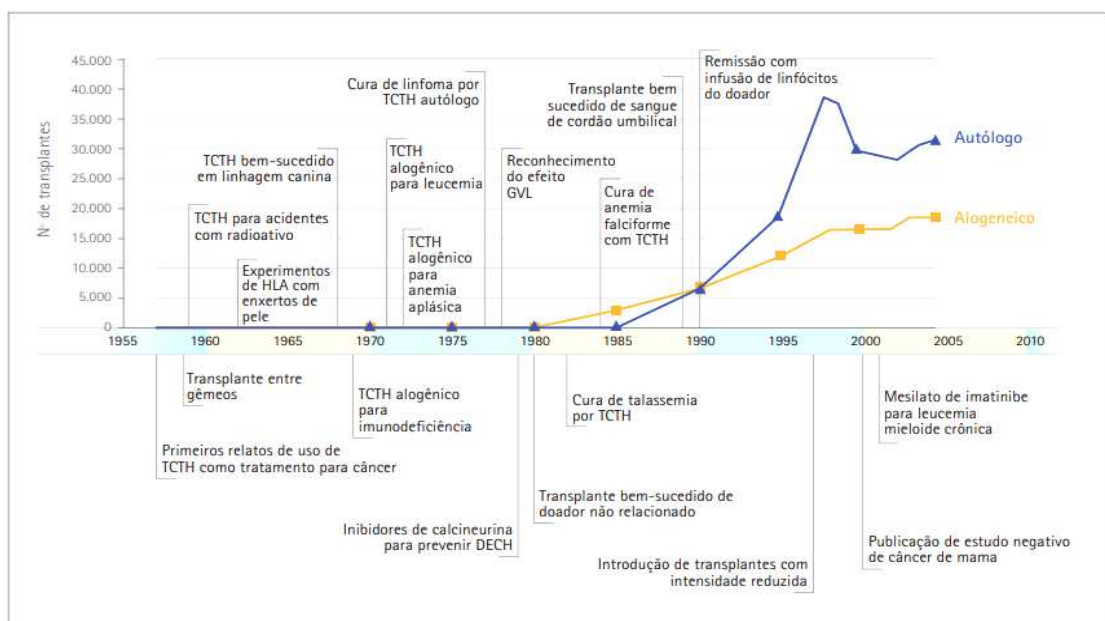


Figura 1.2: Principais etapas de desenvolvimento do transplante de células-tronco no mundo. Adaptado de Appelbaum, 2007.

O Transplante de Células Tronco hematopoiéticas no Brasil

O TCTH, como modalidade terapêutica, foi iniciado em 1979 por hematologistas da Universidade Federal do Paraná. (MACHADO, 2009). Em 1983, foi inaugurado o Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (FERREIRA *et al*, 1985).

Em São Paulo o primeiro transplante foi realizado no hospital Sírio-libanês, através do Dr. Dráuzio Varella (MACHADO, 2009).

Estudos demonstraram que os serviços TCTH aumentaram exponencialmente ao longo dos últimos anos. Até 2006, foram realizados no mundo 40.000 TCTH por ano (RIZZO, 2006).

É importante ressaltar que há um sistema geral de registro, tanto de doadores como de receptores, que possibilitam o intercâmbio, a racionalização e a disponibilização das informações inerentes a compatibilidade das células progenitoras, permitindo um número cada vez maior de TCTH alogênico (RIZZO, 2006).

O Brasil tem hoje 85 Centros de TCTH, 80% deles públicos, com 380 leitos disponíveis. Ao redor de 30 mil transplantes foram realizados em nosso país desde 1979. São feitos ao redor de 2.500 transplantes autólogos e alogênicos por ano. Sendo que em 2015, foram realizados 299 transplantes de doadores não aparentados (SBTMO, 2016).

1.2.2 Aspectos gerais do Transplante de Células Tronco Hematopoéticas

O TCTH consiste na infusão de CTH de variadas fontes e graus de compatibilidade com o receptor, prévia administração de um regime condicionamento com doses de QT e/ou radioterapia (RT) adequadas ao tipo de CTH, cujo objetivo é não apenas eliminar a doença de base, mas também criar espaço real e imune para as novas células tronco. Além disso, é necessário imunossuprimir o paciente para evitar a rejeição das CTH (MARTIN, 2009). As principais fontes de CTHs são a MO, o Sangue Periférico Mobilizado (SPM) e o Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (SCUP) (MARTIN, 2009; APPELBAUM, 2001).

Em relação ao tipo de doador, existem três tipos de TCTH, o autólogo, quando as CTHs são provenientes do próprio receptor; o alogênico, quando as CTHs são provenientes de um doador com diferentes graus de relação genética. O aceite das CTHs dependerá da compatibilidade em relação aos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*), que poderá ser aparentado, não aparentado ou haploidentico. Ainda, existe a modalidade do TCTH singeneico, no qual as células provêm de um irmão gêmeo idêntico (HENSELI, 1998).

A seleção do tipo de transplante autólogo ou alogênico para um paciente depende do tipo de neoplasia, idade do receptor, disponibilidade de um doador

adequado e o acometimento da doença (envolvimento da medula óssea, dentre outros órgãos) (MARTIN, 2009).

Em comparação ao transplante alogênico, o transplante autólogo está prontamente disponível, e não há necessidade de identificar um doador HLA-compatível. Ainda, não há risco de DECH e rejeição do enxerto. A recuperação imunológica é mais rápida que após um transplante alogênico e existe um risco menor de infecções oportunistas. Pacientes idosos podem tolerar bem o transplante autólogo. Na tabela 1.1 pode-se observar as vantagens e desvantagens dessas duas modalidades de transplante.

Tabela 1.1: Vantagens e desvantagens dos TCTH autólogos e alogênicos

TCTH-AUTOLOGO	TCTH-ALOGÊNICO
VANTAGENS	
- Não necessita busca de doador	- Potencial curativo
- Ausência de rejeição.	- Efeito de enxerto contra leucemia
- Mortalidade de 1- 5%	
- Aumenta a sobrevida	
- Recuperação Imunológica mais rápida	
DESVANTAGENS	
- Pode reinfundir células Doentes	- Período de preparação longo
- Não é em alguns casos	- Busca de doador
	- Mortalidade 20%
	- Doença do enxerto contra hospedeiro

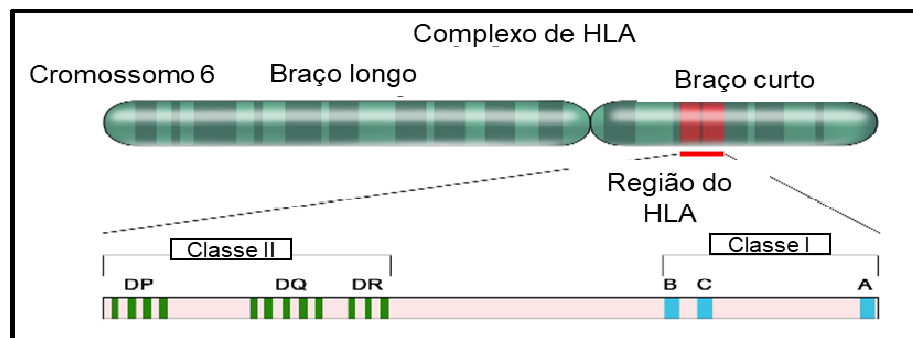
O sucesso do transplante alogênico demanda um equilíbrio imune que permita (i) que as células hematopoéticas do doador infundidas se enxertem no microambiente da MO do receptor, (ii) que o sistema imunológico do receptor tolere o enxerto para que não haja rejeição, e (iii) que as células T efectoras do doador tolerem o tecido do hospedeiro, para não haver Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) (VOLTARELLI; STRACIERI, 2000; APPELBAUM, 2001). Ainda assim, o transplante alogênico aparentado ou não aparentado permanece associado a significativa morbidade e/ou mortalidade, como também ao surgimento de complicações pós transplante (GIEBEL, 2010).

1.2.2.1 O sistema HLA no transplante

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é uma família de genes que tem como função primordial o reconhecimento do que é próprio “self” daquilo que não é próprio “nonself”, formando a base do reconhecimento tissular. As moléculas do MHC são responsáveis pela ligação e apresentação de peptídeos aos

linfócitos T. Em humanos, os genes de MHC foram denominados de HLA (do inglês “*Human Leukocyte Antigens*”) (TORRES, 2010). As moléculas de HLA são expressas nas células nucleadas e não são limitadas aos leucócitos.

Os genes do HLA estão entre os sistemas genéticos mais polimórficos conhecidos, por apresentar um número grande de alelos em cada locus (ABBAS *et al*, 2015). Os genes HLA estão localizados no braço curto do cromossoma 6, e dividem-se em três grupamentos genéticos distintos: Classe I, Classe II e Classe III (Figura 1.3).



© 2012 Terese Winslow LLC
U.S. Govt. has certain rights

Figura 1.3: Cromossomo 6 humano e a estrutura do HLA classes I e II. Fonte: adaptado de <http://www.ufpe.br/biomol/aula-imuno-05.htm>.2011

As moléculas de classe I são consideradas as moléculas clássicas, que incluem as proteínas HLA-A, HLA-B e HLA-C. Os genes de classe I codificam glicoproteínas, expressas na superfície de todas as células nucleadas e são responsáveis por apresentar os peptídeos, endógenos ou virais, às células T CD8+ (ABBAS *et al*, 2015). Os genes de classe II HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR codificam glicoproteínas expressas na superfície de células do sistema imune, especificamente nas Células Apresentadoras de Antígenos (APCs); células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. As moléculas de histocompatibilidade de classe II estão envolvidas na rejeição contra enxertos e na apresentação de peptídeos exógenos aos receptores dos linfócitos T CD4+. Além desses, também são conhecidos vários outros genes de classe III que não codificam moléculas apresentadoras de antígenos, mas codificam outras que podem participar de alguma forma da resposta imune (ABBAS *et al.*, 2015b; JANEWAY, 2002).

Os produtos gênicos do HLA são expressos de forma codominante, sendo que cada indivíduo expressa dois antígenos por *locus*, ambos os alelos que foram herdados dos pais. Para o indivíduo, a codominância maximiza o número de moléculas de HLA disponíveis para ligar peptídeos a fim de serem apresentadas às

células T. Os receptores de antígenos em linfócitos B são as imunoglobulinas que podem reconhecer antígenos em sua forma nativa ou solúvel; os receptores de linfócitos T (TCR) somente reconhecem depois que os mesmos são fragmentados por outras células e estes fragmentos (peptídeos) são apresentados na superfície destas células combinadas às moléculas do HLA. (GREEN, 2013).

1.2.2.2 Sistema HLA e escolha do doador no alo-TCTH

A seleção de um doador com grau adequado de compatibilidade representa uma das estratégias essenciais para o sucesso do transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH).

Dentre os fatores genéticos que exercem maior influência no resultado desses transplantes destacam-se os genes do sistema HLA. O reconhecimento da ação fundamental da alogenicidade das moléculas de HLA, na evolução pós-transplante, levou ao desenvolvimento de novas metodologias para identificação desses genes clássicos (MACHADO, 2009).

O HLA se torna especialmente importante quando considerados os transplantes, visto que a rejeição imunológica se correlaciona com o grau de disparidade existente entre os HLAs do doador e receptor (CANGUSSU, 2008).

Para a realização do transplante alogênico é necessária a tipagem e grau aceitável de compatibilidade HLA. Entretanto, em termos gerais, todos os alelos de um “loci” HLA, pela sua ligação próxima, são transmitidos como uma unidade para a geração seguinte. Esta unidade, chamada haplótipo, engloba a seleção de alelos contidos no complexo HLA de um cromossomo 6 (GREEN, 2013).

Um pai ou mãe e o filho são usualmente haploidênticos o que significa que compartilham um, e somente um, haplótipo HLA. No transplante, devido à codominância, a probabilidade de dois irmãos serem HLA idênticos é de 25%, HLA haploidênticos de 50% ou HLA distintos de 25%, isto é, compartilhar dois, um ou nenhum dos haplótipos parentais (CANGUSSU, 2008).

A tipagem de HLA é realizada no paciente e no doador por sorologia ou biologia molecular para HLA de classe I (A, B, C) e obrigatoriamente pelo método molecular para HLA de classe II (DR, DP, DQ). No Brasil, os doadores são incluídos no REDOME com tipificação HLA A, B e DRB1 em média resolução. A inscrição dos receptores no Registro Nacional de Receptores de Medula óssea (REREME) deve ser realizada com tipificação HLA classe I e II em alta resolução porque estas

informações direcionam a seleção e, deste modo, agilizam o processo de identificação do doador (PEREIRA *et al*; GREEN, 2013).

As CTHs de doadores devem ser idênticas nos loci HLA A, B, C, DRB1 e DQB1. A primeira escolha é, na maioria, das vezes o doador HLA familiar idêntico. Na ausência de um doador familiar, a melhor opção é o doador HLA idêntico 10/10 (compatibilidade em todos os *loci* investigados) e, algumas vezes, um doador não aparentado em 9/10. A probabilidade de identificação de um doador adequado é estimada entre 30% e 40%, sabendo-se que nem todas as populações não são uniformemente representadas nos registros. O aumento do número de doadores disponíveis em nível internacional (15 milhões de doadores) explica o aumento dramático nos transplantes não aparentados nos últimos anos (MACHADO, 2009).

Outro fator que vem contribuindo para a melhoria do sucesso do transplante e das taxas de sobrevida global é a melhor compreensão da herança genética e critérios de seleção do doador baseado no HLA. Em relação aos fatores genéticos tem se levado em conta, na seleção dos doadores irmãos, os princípios de tolerância aos antígenos maternos (NIMA) ou paternos (NIPA) herdados (SYMONS, 2008).

Devido a estas diferenças nos antígenos de compatibilidade, o TCTH haploidêntico e o parcialmente compatível devem ser indicados de maneira racional, pois se trata de um transplante mais complexo, que envolve regimes de condicionamento específicos, controle e tratamento diferenciado da DECH, vigilância e tratamento das infecções e exames de última geração, um banco de sangue envolvido no programa e equipe médica e multidisciplinar treinada (TIERCY,2000).

O TCTH com doador HLA-parcialmente idêntico tem trilhado um longo caminho nos últimos vinte anos; contudo, a descoberta da infusão de megadoses de células CD34, técnicas mais apuradas da depleção de células T, possibilidade de condicionamentos não mieloablativos, novas técnicas para a reconstituição imune aliadas a melhores antimicrobianos e antifúngicos, suporte microbiológico, suporte dos bancos de sangue e vivência neste tipo de tratamento ao longo dos anos, tem tornado esta modalidade de tratamento factível, e uma opção nas crianças e adultos com leucemias avançadas e de alto risco que não dispõem de doador HLA totalmente compatível aparentado ou não aparentado (MACHADO, 2009).

1.2.3 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas alogênico aparentado e não aparentado

O TCTH é alogênico quando a fonte de CTH é proveniente de doador diferente do receptor, comumente de indivíduos compatíveis imunogeneticamente, mais especificamente HLA-idênticos, seja de um indivíduo da família (aparentado ou relacionado), ou de uma pessoa não aparentada (TCTH alogênico não aparentado ou não relacionado). A histocompatibilidade é obrigatória para um transplante alogênico sobretudo na prevenção da DECH e da rejeição, uma vez que a CTH enxertada mantém seu sistema imunológico intacto (HENSE, 1998).

Em pacientes com malignidade hematológica sem um irmão HLA idêntico disponível ou doador não relacionado, o uso de transplante de células hematopoéticas haploidênticas (TCTH-haplo), usando ciclofosfamida pós-transplante como profilaxia da DECH, tem aumentando rapidamente nos últimos anos. No entanto, apesar do sucesso deste tipo de transplante, os doentes submetidos a transplante de doador familiar haploidêntico (50% compatível) são aqueles com maior atraso da recuperação imunológica pós-transplante. Este aspecto parece ter influência nas complicações pós-transplante, principalmente nas infecções e reativações virais (AVERSA, 2011)..

1.2.4 Desenvolvimentos clínicos e terapêuticos no TCTH-haploidêntico

Esta modalidade de transplante parte da premissa de que quase todos os pacientes têm um familiar que é idêntico para um dos haplótipos HLA (50% "match"), e que está disponível para a doação. Cada pai preenche este critério, assim como metade dos irmãos. Neste contexto, o haplótipo HLA compartilhado permite uma reconstituição imune das células T que realizam reconhecimento antigênico de forma restrita ao HLA (SBTMO, 2012).

Os estudos iniciais que embasaram os TCTH haplofamiliares surgiram no início dos anos 70 em modelos animais, em que foi demonstrado que a administração de altas doses de ciclofosfamida depois do TCTH poderia diminuir a DECH e a rejeição sem prejuízo para as células progenitoras. Outros trabalhos em roedores nos anos 80 mostraram o caminho da depleção de células T *ex-vivo*, contribuindo para o desenvolvimento do TCTH-haploidêntico (POWLES,1983).

Powles *et al* 1983, publicaram os primeiros resultados em 35 pacientes portadores de leucemia aguda submetidos a TCTH com doadores familiares com 1 a 3 loci HLA-diferentes, empregando como condicionamento a irradiação corporal total

(TBI) e ciclofosfamida, ou ciclofosfamida e melfalano. Dos 35 pacientes, 11 sobreviveram mais de 6 meses e apenas 5 mais de 2 anos. A falha da enxertia ocorreu em 29% dos pacientes e a DECH em 80% dos casos. Embora esses primeiros resultados tenham sido desanimadores, serviram para demonstrar que o transplante haplofamiliar tinha potencialidade e mediante manipulações farmacológicas e do enxerto, poderia ter uma aplicação no futuro (POWLES Em 1983).

Na sequência, os TCTH haploidênticos familiares tentaram reduzir a falha do enxerto aumentando a mieloablação, associando a citarabina e o etoposídeo ao TBI e a ciclofosfamida. As altas taxas de DECH verificadas foram abordadas usando a MO como fonte de células, intensificando a imunoprofilaxia, e associando timoglobulina (no período pré-TCTH) e ciclofosfamida (no pós-TCTH) à ciclosporina e corticosteroides. Essas diretrizes adotadas levaram Polchi et al. em 1995 a descreverem resultados animadores, com redução significativa da rejeição e das DECH aguda e crônica, mas com incremento nas complicações infecciosas (POLCHI; 1995).

O próximo avanço foi a introdução da administração de megadoses de células progenitoras CD34+ periféricas. Trinta e cinco pacientes portadores de leucemias agudas com prognóstico desfavorável ou em recaída foram submetidos a um regime de condicionamento composto por TBI combinados a tiotepa, ciclofosfamida e timoglobulina e posterior infusão de medula óssea do doador haploidêntico familiar. Na sequência, o receptor recebia suplementação com megadoses de células progenitoras periféricas CD34+ do doador (10×10^6 /kg) que haviam sido depletadas de células T. O TCTH era conduzido sem nenhuma imunossupressão. Os resultados foram surpreendentes, com 80% de enxertia, 17% de DECH aguda, 43% de sobrevida livre de doença na LMA e 30% na LLA, mas com alta incidência de citomegalovirose e aspergilose (AVERSA, 2011).

A partir desses resultados, foram adotadas modificações no protocolo inicial, consistentes em aplicar TBI 800 cGY (dose única em adultos e fracionada em crianças), substituir a ciclofosfamida pela fludarabina, reduzir a dose de timoglobulina, infundir células progenitoras periféricas preferencialmente, aumentar as megadoses de células CD34+ de 10 para 12×10^6 /kg, diminuir um log na depleção de células T para 2×10^4 /kg e manter os pacientes sem imunossupressão para DECH. Os resultados mostraram incremento na sobrevida e diminuição da toxicidade (AVERSA, 2011).

Na atualidade, muitos destes transplantes envolvem "*mismatches*" de todos os *loci* HLA classe I e II, situação que tem como consequência o desenvolvimento de DECH grave e prognóstico ruim (ABBAS *et al*, 2015). O transplante haploidêntico, HLA-"*mismatched*", com intensificação do condicionamento e mega-dose de enxerto obtidas a partir de coleta de CTHs periféricas, tem alcançado melhores resultados. A DECH é prevenida por infusão de células CD34+ altamente purificadas, depletadas de células T e pelo uso de ciclofosfamida no pós-transplante (COPELAN, 2006). Com todos estes avanços, a pega é bem-sucedida e a ocorrência da DECH é muito pequena. A depleção de células T do doador visando uma diminuição da DECH, permite pressupor que não haveria um efeito significativo de Enxerto Contra Leucemia (GVL) mediado por células T. No entanto, a descoberta do efeito do enxerto contra o tumor ou leucemia (GVT ou GVL) mediado por células Natural Killer (NK) no TCTH- haploidêntico estimulou a aplicação dessa modalidade de transplante no tratamento das leucemias (CHIBAS *et al*, 2005). Entretanto, este tipo de transplante acarreta outras complicações como o retardo na reconstituição imunológica e um aumento de infecções oportunistas e reativações virais latentes (AVERSA, 2011).

1.2.4.1 Regimes de Condicionamento

O condicionamento é o regime preparatório prévio à infusão de CTHs. O condicionamento tem como principais objetivos criar um espaço na medula óssea para receber as células transplantadas e permitir a enxertia, a imunossupressão do paciente para prevenir rejeição das células do enxerto pelas células imunocompetentes do receptor e obter a erradicação da doença (COPELAN, 2006; KOLINS, 2011). Os regimes de condicionamento podem ser chamados de mieloablativo, quando a toxicidade implica em citopenias irreversíveis e dependentes de CTH para a recuperação da hematopoese, ou não-mieloablativos, quando as citopenias são menos importantes e a MO pode se recuperar independentemente da infusão de CTHs. Os regimes de intensidade reduzida seriam aqueles intermediários (KOLINS, 2011).

Inicialmente, acreditava-se que a infusão de CTH era apenas necessária para reconstituir a hematopoese normal do paciente. No entanto, a associação do desenvolvimento da DECH com uma menor chance de recaída após o transplante levou ao conceito de GVL. Estudos mostraram a importância das células T do enxerto tanto para o desenvolvimento de DECH como para o efeito GVL, tendo sido

relatadas remissões duradouras após a infusão de linfócitos do doador (DLI) (COPELA, 2006).

No final da década de 90, com um melhor entendimento do GVL e a possibilidade de infusão de linfócitos do doador (DLI) após o transplante para aumentar este efeito, foram desenvolvidos regimes de condicionamento de intensidade reduzida (RIC), os quais são essencialmente imunossupressores; tais regimes possuem a vantagem de diminuir os efeitos tóxicos do condicionamento, com importante uso para pacientes idosos e portadores de comorbidades, porém estão associados a altas taxas de recaídas (COPELAN,2006). A maioria destes regimes são baseados no uso da fludarabina como um agente alquilante (melfalano, ciclofosfamida ou Bussulfano), com ou sem adição de uma globulina anti-timocitária (ATG) ou alemtuzumab. O RIC tem como objetivo causar imunossupressão suficiente para permitir a "pega" das CTH e, devido a isso, é menos agressivo e causa complicações menos intensas em comparação ao condicionamento mieloablativo (APPERLEY; CARRERAS, 2008).

No TCTH haploidêntico, com o fim de reduzir a falha do enxerto foi aumentada a mieloablação, associando a TBI e ciclofosfamida a citarabina e o etoposide. Para combater as altas taxas de DECH, foi intensificada a imunoprofilaxia, associando timoglobulina (no período pré-TMO) e ciclofosfamida (no pós-TMO) à ciclosporina e corticosteroides, e indicando a MO como fonte preferencial de células. Essas diretrizes adotadas, levaram Polchi *et al.* em 1995 a descreverem resultados animadores, com redução significativa da rejeição e da DECH aguda e crônica, mas com incremento nas complicações infecciosas (POLCHI P *et al.*, 1995).

1.2.4.2 Reconstituição imunológica após o TCTH alogênico

Realizada a infusão das células progenitoras hematopoéticas, a reconstituição da MO e com ela, da hematopoese, consiste de dois fenômenos distintos: a recuperação numérica dos elementos celulares da medula e a recuperação funcional das interações celulares (TOUBERT, 2012).

Conhece-se como "enxertia" ou "pega" ao processo pelo qual as CTHs do doador reconhecem nichos específicos no compartimento hematopoético central, a MO, e retomam funcionalidade para produzir elementos do sistema hematopoético, reiniciando assim uma hematopoese normal e centralmente tolerante. Os leucócitos são a primeira linhagem a ser recuperada, erguida pela produção dos eritrócitos e,

finalmente, das plaquetas. A enxertia dos leucócitos é definida como uma contagem absoluta de neutrófilos (ANC) no sangue periférico $> 500/\text{mm}^3$ por três dias consecutivos. A pega plaquetária é definida por uma contagem de plaquetas $>20.000/\text{mm}^3$ quando não existe suporte transfusional nos 7 dias antecedentes ao TCTH (BAEK *et al.*, 2001; KOLINS *et al.*, 1997). O tempo para ocorrer a enxertia depende de fatores como dose celular infundida e a fonte de CTH empregada. Em geral, a enxertia dos neutrófilos ocorre de 10 a 21 dias após a infusão de CTH da MO, e de 10 a 28 dias após a infusão de CT do cordão umbilical (KOLINS *et al.*, 2011).

A recuperação funcional dos linfócitos e das células imunes efetoras ocorre gradualmente, podendo demorar um ano ou mais para o receptor desenvolver uma imunidade celular e humoral adequada. Esta recuperação é dependente de fatores que envolvem a idade do receptor, a patologia inicial, as diferenças no HLA e em antígenos de histocompatibilidade secundários, a depleção das células-T, a terapia de condicionamento e prevenção da DECH, as complicações pós-transplante tanto na DECH aguda como crônica, bem como, a recaída de doenças e estados infecciosos prévios ao transplante (TOUBERT, 2012).

A recuperação da hematopoese começa pelos granulócitos, seguidos dos linfócitos, bem como, as hemácias e plaquetas. A recuperação da contagem de neutrófilos após um transplante alogênico de CTHs é rápida, verificando-se cerca de 9 a 20 dias após o transplante dependendo da fonte de CTHs, da utilização de fatores de crescimento de granulócitos e da utilização de metotrexato para prevenção da DECH (APPERLEY, 2008).

Quanto à fonte de CTHs, a recuperação de neutrófilos maduro que apresentam o fenótipo CD45+CD65+ é mais rápida após transplante de CTH do SP, seguida da MO, sendo o transplante de cordão umbilical aquele com mais atraso na pega. O intervalo em que se verifica neutropenia profunda é o de maior risco para infecções oportunistas no período imediato pós-transplante. No entanto, ao surgirem neutrófilos do doador, que são invariavelmente o primeiro sinal da pega do enxerto, aumenta a proteção do paciente contra infecções bacterianas e fúngicas precoces. O número de monócitos retorna ao normal no sangue periférico de três a quatro semanas após-transplante (CORNELISSEN, 2002; SEGGEWIS, 2010).

Os linfócitos granulares com atividade *natural killer* (NK) constituem a maior parte de linfócitos que repovoam o sangue periférico durante os primeiros 100 dias. Elas são os primeiros linfócitos a se recuperarem após o TCTH, independente da fonte do enxerto, sendo capazes de mediar a resposta imune inicial, uma vez que a recuperação das células T é mais tardia (CORNELISSEN, 2002). As células NK têm a capacidade de lisar células-alvo, além de produzirem grandes quantidades de citocinas que estimulam o desenvolvimento de células do sistema imune adquirido. As principais citocinas imunomodulatórias produzidas por estas células incluem TGF- β , IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , e, além destas, GM-CSF, G-CSF, IL-3, as quais regulam a hematopoese e dos processos de diferenciação celular. As células NK maduras apresentam o fenótipo CD3⁻ CD56⁺ CD16⁺, e alcançam níveis quantitativos e funcionais normais durante o primeiro ano pós-TCTH (CORNELISSEN, 2002; SEGGEWIS, 2010).

As células dendríticas são as células apresentadoras de antígenos profissionais. No sangue periférico, a recuperação das células dendríticas mielóides, as quais expressam CD11c⁺, ocorre nos três primeiros meses após o TCTH. Já para as células dendríticas de origem plasmocitóide, que expressam CD123⁺, a sua contagem se restabelece somente a partir de um ano após a realização do TCTH.

Os monócitos constituem outra linhagem celular mioelide que constituem cerca de 10% dos leucócitos circulantes (LU *et al.*, 2017). São células com capacidade imunológica efetora, equipadas com receptores de quimiocinas e de moléculas de adesão que medeiam a migração celular entre a corrente sanguínea e os locais de inflamação, onde fazem o reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogénicos (HUANG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019). Da ativação subsequente pode seguir uma diferenciação para macrófagos e/ou células dendríticas e a produção de mediadores e citocinas inflamatórias com capacidade moduladora da resposta imunológica inata e adaptativa. Em relação aos monócitos circulantes, com base na expressão diferencial do CD14⁺ (componente do receptor do lipopolissacarídeo LPS) e do CD16⁺ (Fc γ RIII), são reconhecidas duas subpopulações celulares distintas. Os monócitos clássicos apresentam um fenótipo CD14⁺CD16⁻, enquanto uma população minoritária ($\pm 10\%$) apresenta a expressão de ambos os marcadores CD14⁺ CD16⁺ (TAN *et al.*, 2018). As duas subpopulações expressam perfis de citocinas diferentes e um repertório de receptores de superfície distinto. (LU *et al.*; 2017; TAN *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019) a

reconstituição dos monócitos atingem suas contagens normais em torno de 30 dias após o TCTH, independente da fonte de células.

A recuperação da função linfocitária T e B é mais tardia que a dos neutrófilos e das células NK (APPERLEY, 2008). Este atraso no amadurecimento funcional dos linfócitos é devido a duas razões principais: (i) estas células estão sendo originadas dentro de um ambiente relativamente alogênico, onde existem diferenças de histocompatibilidade maiores e menores entre o doador e o receptor; e (ii) ainda, porque há um intervalo de tempo considerável entre o desenvolvimento funcional dos linfócitos e sua migração para os órgãos linfoides específicos. Um outro fator essencial para a supressão da função linfocitária é a administração de agentes imunossupressores pós-transplante, com o objetivo principal de minimizar os efeitos e a gravidade da DECH (SEGGEWIS, 2010). Os fármacos, como a ciclosporina e, especialmente, o metotrexato, utilizados para a profilaxia de DECH, resultam na destruição seletiva de linfócitos T antígeno-específicos (SEGGEWIS, 2010).

A reconstituição do sistema imune do receptor exige a formação de novos linfócitos T antígeno-específicos, derivados das CTH do doador. A formação destes novos linfócitos é dependente da função tímica do receptor, a qual vai diminuindo em função da idade e tem demonstrado uma correlação inversa entre a idade e a capacidade do paciente para gerar linfócitos *naive* CD45RA⁺ (CORNELISSEN, 2002). Os linfócitos-T *naive*, capazes de se diferenciarem em células-T antígeno-específicas, respondem pela manutenção da imunidade celular e humoral nos receptores de TCTH (TOUBERT, 2012).

Após o TCTH a reconstituição linfocitária é geralmente lenta. O número total de linfócitos tende a retornar ao normal em 3 meses, porém o número de células CD4⁺ permanece baixo por cerca de 12 meses após o procedimento, ou mais, se o paciente apresentar DECH. Geralmente o número de células CD8⁺ retorna ao normal precocemente, assim como as células NK (APPERLEY, 2008). O processo de reconstituição dos componentes do sistema imune adquirido caracteriza-se pelo rápido surgimento de linfócitos T CD8⁺. Diversos estudos sugerem que a rápida recuperação destas células ocorre através de um caminho alternativo de imunoreconstituição, denominado expansão homeostática periférica, resultando em uma expansão clonal das células do doador infundidas no momento do TCTH, ou através de células residuais do hospedeiro que respondem a citocinas ou a antígenos.

A contagem de linfócitos T CD4⁺ é reduzida a níveis subnormais após o transplante, permanecendo assim até após um ano pós-TCTH. Dentre a subpopulação de linfócitos T CD4⁺, as células *naive* CD4⁺CD45RA⁺ são menos frequentes que as células T CD4⁺ de memória CD4⁺CD45RO⁺ (SEGGEWIS, 2010).

Em indivíduos saudáveis a contagem de CD4 é maior que a de CD8; já nos receptores de transplante ocorre o inverso, uma vez que o receptor apresenta uma limitada habilidade para produzir células T CD4⁺ *naive*. Isto pode ser devido em parte a que o epitélio tímico tem um papel mais importante no desenvolvimento de células T *helper* que na diferenciação de células T citotóxicas (APPERLEY, 2008). A produção de células T CD8⁺ *naive* é menos afetada e levanta-se a hipótese de que poderia haver produção extratímica destas células (TOUBERT, 2012).

As células T regulatórias, cujo fenótipo é CD4⁺CD127⁺CD25^{high}, expressam o fator de transcrição FOXP3 e são muito estudadas no contexto do TCTH. De acordo com alguns autores, sua função fisiológica seria a de prevenir o surgimento de doenças autoimunes e também poderiam apresentar o mesmo efeito sobre doenças autoimunes como a DECH. Após o TCTH, seus níveis estão baixos, mas aumentam rapidamente no primeiro mês (APPERLEY, 2008).

A recuperação quantitativa dos linfócitos B circulantes ocorre mais tardiamente e segue algumas etapas distintas; inicialmente, num período de três a seis meses após o transplante, a contagem das células B é baixa; esta contagem, no entanto, aumenta rapidamente, conduzindo a um nível supranormal entre seis a 24 meses depois do transplante, seguida de uma subsequente normalização, provavelmente durante os anos seguintes (KOLINS *et al*, 1997). Na ausência de terapia imunossupressora prolongada e DECH crônica, a ativação, proliferação e secreção de *IgM* gradualmente retorna ao normal. A única anormalidade que persiste por mais de um ano após o transplante é a produção insuficiente de *IgG* e *IgA*. As células foliculares dendríticas, que dão suporte para a seleção antigênica encontram-se com suas contagens diminuídas até o primeiro ano após o TCTH, contribuindo para a lenta regeneração das células B de memória (TOUBERT, 2012). Em pacientes que desenvolveram DECH crônica, defeitos nos processos de ativação, proliferação e diferenciação tendem a persistir por cerca de um ano após o transplante (TOUBERT, 2012).

Com o regime de condicionamento, os receptores do TCTH perdem a memória imunológica a agentes infecciosos e vacinas obtidas ao longo da vida. Conseqüentemente, a reimunização após o TCTH é necessária quando o indivíduo retoma a imunidade humoral (TOUBERT, 2012).

1.2.5 Efeitos imunológicos e complicações pós-Transplante de Células Tronco Hematopoéticas

1.2.5.1 Efeito enxerto versus leucemia no TCTH alogênico

O efeito GVL refere-se à capacidade que os linfócitos alogênicos, presentes no enxerto, ou derivados do enxerto ou infundidos após o transplante, tem em destruir as células tumorais presentes no receptor. A gestão do pós-transplante inclui um balanço desta alorreatividade terapêutica com a alorreatividade nociva da DECH (MARTIN, 2005).

A capacidade GVL é largamente dependente da imunidade mediada por células T, pelo que a depleção de células T no enxerto condiciona a menor eficácia da resposta do enxerto contra a neoplasia (RUGGERY *et al*, 2008).

As células NK são a primeira população linfocitária a se reconstituir após-TCTH e tem vindo a ser avaliado o seu potencial de efeito no enxerto contra leucemia (GVL), que parece ser predominantemente dirigido contra células leucêmicas da linhagem mieloide. Os pacientes com leucemias mieloide, submetidos a alo-TCTH haploidêntico com enxerto depletado de células T, com disparidades KIR-Ligando com o HLA, mostraram uma capacidade significativa de controle da doença; devido a atividade antitumoral das células NK, derivadas do enxerto, contra as células leucêmicas com disparidade dos receptores KIR do doador (VICENT, 2011).

No transplante com compatibilidade HLA, o qual a alorreatividade NK mediada pelos receptores KIR é irrelevante, outros estudos exploraram a imunogenética dos receptores KIR no doador e receptor e indicaram que o conteúdo de genes de receptores de ativação e/ou a expressão de determinados receptores KIR está associado a um menor risco de recidiva de leucemias mieloide (MARTIN, 2005; VICENT, 2011).

1.2.5.2 Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH)

Além da recaída da doença, a Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) é a principal complicação associada ao TCTH, tanto em relação à morbidade quanto na mortalidade. A DECH apresenta características semelhantes a um processo autoimune e sua patogênese ainda é parcialmente conhecida e pode se dar em dois estádios – aguda (DECHa) ou crônica (DECHc) (ABBAS *et al*, 2015).

A DECH ocorre quando os linfócitos T do doador reconhecem como estranho os antígenos do receptor (FERRARA *et al*, 2009). Embora a DECH seja iniciada por linfócitos T enxertados que reconhecem aloantígenos do hospedeiro, as células efetoras que causam a lesão celular epitelial estão menos bem definidas. Na sua forma aguda, a DECH está envolvida na ativação de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e células imune efetoras que resultam na injúria tecidual em órgãos específicos.

A disparidade HLA é o fator de maior importância na predisposição dos pacientes a desenvolverem DECHa. O processo geralmente ocorre nas primeiras semanas após o transplante; o modelo proposto para o aparecimento da DECHa tem três fases. Na primeira fase o regime de condicionamento produz injúria tissular, e quimiocinas e citocinas inflamatórias são liberadas e as células dendríticas do receptor são ativadas no baço e nos tecidos periféricos (FERRARA *et al*, 2009).

Após a infusão das CTH, as células T do doador reconhecem antígenos do receptor manifestados pelas células apresentadoras de antígenos (APC) ativadas e fazem uma expansão clonal. Assim, mais quimiocinas e citocinas são liberadas e as células efetoras não específicas, como células NK, monócitos e macrófagos, são ativadas. Na terceira fase, ocorre a injúria dos tecidos, onde células morrem por apoptose na pele, no fígado, no intestino e no próprio sistema hematopoético. As manifestações podem ser restritas a um órgão ou disseminadas com consequências locais ou sistêmicas debilitantes e mortalidade associada à imunossupressão crônica e infecções oportunistas (ABBAS *et al*, 2015). Na tabela 1.2 é mostrado o sistema de estadiamento da DECHa por órgão.

Tabela 1.2: Estadiamento da DECH aguda

Estágio	Achados cutâneos	Achados hepáticos	Achados intestinais
1	Exantema maculopapular em <25% da superfície corporal	Bilirrubina: 2-3 mg/dL	Diarreia (500-1000 mL) persistente e náuseas; crianças 10-19,9 ml/kg/dia
2	Exantema maculopapular em 25-50% da superfície corporal	Bilirrubina: 3-6 mg/dL	Diarreia (1000-1500 mL); crianças 20-30 ml/kg/dia
3	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina: 6-15 mg/dL	Diarreia > 1500 mL; crianças > 30 ml/kg/dia
4	Descamação e bolhas	Bilirrubina > 15 mg/dL	Dor com ou sem obstrução

Fonte: Przespiorka *et al*, 1995

A DECH crônica tem manifestações clínicas e patológicas diversas da DECH aguda (ABBAS *et al*, 2015), sendo a maior causa de morbidade e mortalidade tardia do TCTH alogênico, em 30-70% dos pacientes. As manifestações clínicas quase sempre aparecem no primeiro ano do transplante, mas alguns casos desenvolvem muitos anos após o transplante. A fisiopatologia da DECHc envolve inflamação, imunidade celular, humoral e fibrose (VOGELSANG *et al.*, 2003).

1.2.5.2.1 Profilaxia para DECH

A profilaxia da DECHa tem como foco principal a imunossupressão das células do doador. Não existe um regime padrão. A escolha deve ser baseada considerando a doença de base, o grau de incompatibilidade do HLA, o regime de condicionamento e as características do paciente. (RUUTU T *et al.*, 2012)

Uma das estratégias farmacológicas para a prevenção da DECH é a profilaxia baseada nos inibidores da Calcineurina; onde a inibição da enzima citoplasmática calcineurina, que é importante para a ativação dos linfócitos T. Os inibidores da calcineurina, ciclosporina e tacrolimo, têm mecanismos de ação, eficácia clínica e efeitos colaterais similares. Os efeitos adversos comuns são a hipomagnesemia, hipercalcemia, hipertensão e nefrotoxicidade. Efeitos colaterais graves incluem microangiopatia trombótica e neurotoxicidade, complicações que podem levar a suspensão precoce. Devido a nefrotoxicidade, outros medicamentos nefrotóxicos devem ser evitados. Caso ocorra, medicamentos alternativos podem ser utilizados

(ex., sirolimo, ácido micofenólico) (SCHREIBER SL *et al.*, 1992; INAMOTO Y *et al.*, 2011; RUUTU T *et al.*, 2014).

O metotrexato é utilizado num período curto (dias D+1, D+3, D+6 e D+11 após o TCTH alogênico) e combinado com a ciclosporina, que é suspensa no fim dos 6 meses. A combinação da ciclosporina e metotrexato é o regime de profilaxia para a DECHa mais usado e o mais comum nos pacientes que recebem um regime de condicionamento mieloablativo (STORB R *et al.*, 1986; INAMOTO Y *et al.*, 2011).

A globulina antitimocítica (ATG) pode ser adicionada nos regimes de profilaxia para os pacientes submetidos a um TCTH com doadores não aparentados, haploidênticos, com condicionamento mieloablativo ou de intensidade reduzida (THEURICH S *et al.*, 2012). A ATG é uma imunoglobulina policlonal contra os linfócitos T humanos. O interesse na profilaxia da DECH é baseado no conceito de que a DECH é causada por linfócitos T do doador. Estudos sugerem que a ATG é efetiva para diminuir a DECHa e DECHc, sem aumento da recidiva e mortalidade não relacionada à recidiva que, porém, não se traduziram em aumento da sobrevida global (BACIGALUPO A T *et al.*, 2001; THEURICH S *et al.*, 2012)

1.2.5.3 Infecções no pós-TCTH

Apesar dos avanços nos regimes de condicionamento e no tratamento das complicações pós-transplante alogênico, as infecções continuam sendo a grande causa de morbimortalidade nestes pacientes (DELANEY, 2009).

Visto o grau de neutropenia, as rupturas das barreiras anatômicas (mucosite, cateteres centrais - vasculares ou urinários), a depressão das funções de linfócitos T e B e o uso de agentes imunossupressores, os receptores de TCTH alogênico têm alto risco de uma variedade de infecções. Essas infecções podem ser causadas por bactérias, fungos e vírus, dependendo do tempo de transplante. O momento da reconstituição imunológica determina o tipo de infecção (BROWN, 2005).

A primeira fase é a de aplasia, após o regime de condicionamento até a recuperação dos neutrófilos. Nessa fase, as complicações infecciosas não diferem daquelas encontradas em outros pacientes neutropênicos, exceto pela lesão da mucosa intestinal. Nesse período, há também o aumento do risco de infecções fúngicas, principalmente a aspergilose; e as reativações de infecções virais, principalmente pelo vírus Herpes simplex (HSV). A mortalidade por infecção nesse

período ocorre associada à sepse bacteriana, à pneumonia e às infecções fúngicas que também são frequentes (DELANEY, 2009).

Com a pega do enxerto inicia-se a regeneração hematopoética em que os doentes fazem a recuperação mieloide e saem da neutropenia e da trombocitopenia. A segunda fase corresponde a este período até o terceiro ou quarto mês pós-TCTH e se caracteriza por deficiência imune celular, com a diminuição do número e da função de células citotóxicas. Ocorrem infecções por CMV e outros vírus, como adenovírus, vírus entéricos e respiratórios. O principal fator a retardar a recuperação imunológica e favorecer as infecções é a ocorrência de DECH (CASTAGNOLA, 2004).

De fato, nesta etapa há os maiores riscos de complicações imunológicas graves alorreativas e inflamatórias como a rejeição de enxerto, DECHa, complicações pulmonares devido a agressão inflamatória e infecciosa. Permanecem elevados os riscos de infecção por reativação de vírus da família *Herpesviridae*, como o Citomegalovirus (CMV), o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus varicela zoster (VZV), o Herpes Humano tipo 6 (HHV-6), etc. Outros vírus como o BKV, os adenovírus etc. também causam infecções clinicamente importantes no pós-TCTH. No final deste período, sobem os riscos de recidiva da doença maligna primária incluindo as doenças linfoproliferativas, mielodisplásicas e leucemias (HOLLINGSWORTH, 2008).

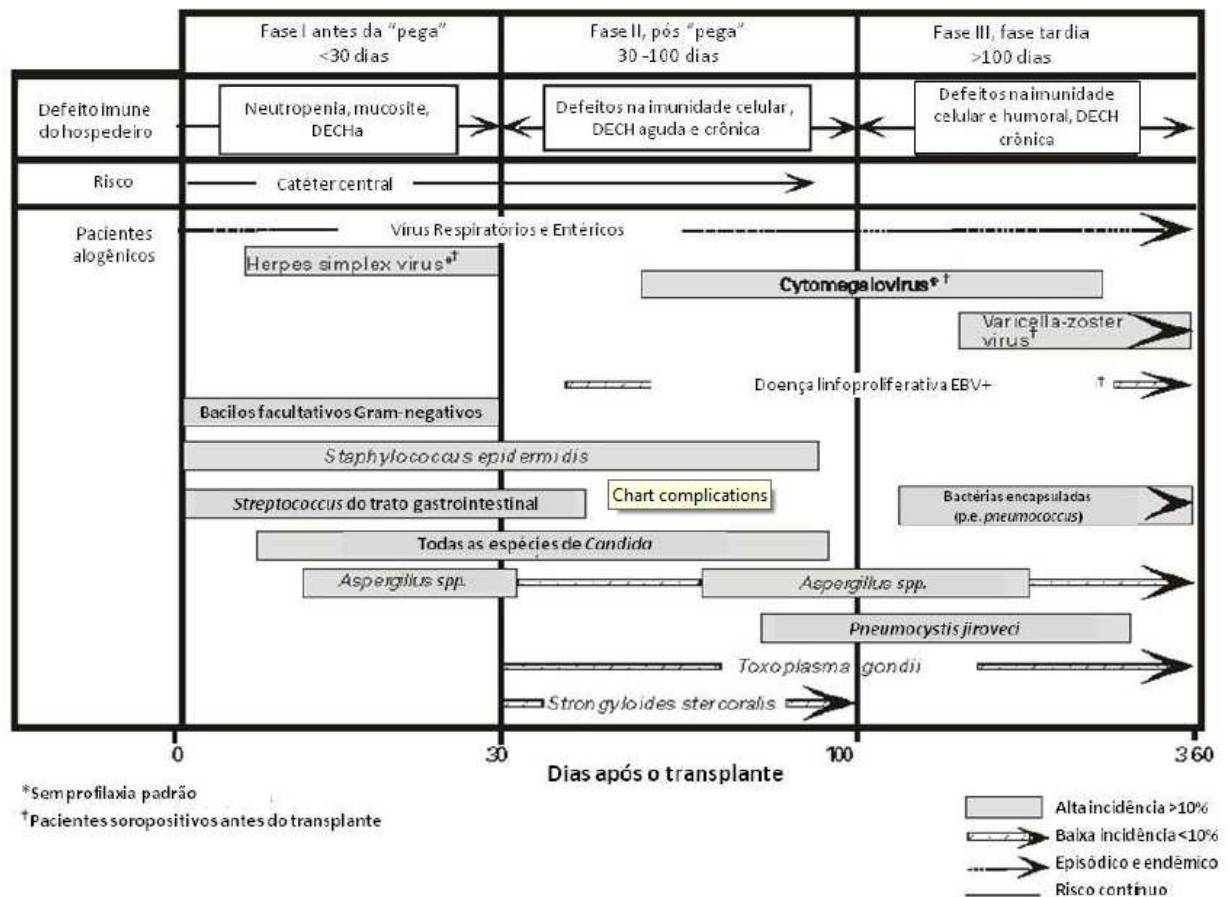


Figura 1.4: Fases das infecções em receptores de transplante alogênico. As três fases das infecções oportunistas correspondem ao período de início da recuperação imunológica antes da pega <30 dias, pós-pega 30-100 dias e fase tardia >100 dias; e as diferentes tipos de infecções encontradas. Adaptado de Colares, 2013.

A terceira fase, que se inicia aproximadamente no quarto mês ($\approx D+100$), é considerada uma fase tardia. A recuperação imunológica está relacionada com a presença e a gravidade da DECH. A maioria dos pacientes tem deficiência de imunoglobulinas (Ig), principalmente da imunoglobulina G2 (IgG2), que é responsável por uma diminuição na resposta a antígenos polissacarídeos. Receptores de TCTH alogênico são extremamente vulneráveis a bactérias encapsuladas (DELANEY, 2009).

As infecções virais pós-TCTH alogênico geralmente decorrem da reativação de infecções virais latentes. As mais frequentes são causadas pelos herpesvírus (vírus Herpes simplex, Varicella-Zoster, EBV, CMV e Herpesvírus humano 6), adenovírus e poliomavírus, assim como pelo BK vírus (HOLLINGSWORTH, 2008). Mais raramente ocorrem infecções por enterovírus, vírus respiratório sincicial (VRS), influenza, parainfluenza, rotavírus e parvovírus B19 (HOLLINGSWORTH, 2008).

A infecção por adenovírus no período pós-TCTH normalmente causa cistite hemorrágica, pneumonite ou hepatite. A cistite hemorrágica também pode ter como agente etiológico o poliomavírus BK (HOLLINGSWORTH CL, 2008).

O Herpes simples é causa frequente de infecção, decorre da reativação da infecção em pacientes soropositivos. A manifestação mais precoce é a lesão de mucosa. São lesões dolorosas, podendo servir como porta de entrada para bactérias e fungos (BROWN, 2005).

A infecção primária ou reativação do vírus Varicella-Zoster (VZV) pode ser grave, comprometendo pele e mucosas com menor ou maior extensão. A infecção ou reativação do Herpesvírus humano 6 (HHV-6) pode ser assintomática ou pode estar associada a retardo na recuperação hematopoética, encefalite e trombocitopenia prolongados. O EBV pode levar à doença linfoproliferativa pós-transplante B (PTLD), que oferece maior risco em pacientes que recebem enxerto depletado de células T e pacientes condicionados com timoglobulina com elevada letalidade (HOLLINGSWORTH, 2008).

1.2.5.3.1 Principais herpesvírus associados com infecção sistêmica do paciente transplantado

O Citomegalovírus (CMV) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*. O ciclo replicativo do CMV, como o de todos os herpesvírus, consta de duas fases: um período latente, em que o vírus permanece dentro das células-alvo replicando-se simultaneamente com o genoma celular, e uma fase lítica, em que o vírus reassumem a replicação ativa, gerando partículas virais infecciosas (LANDOLFO *et al*, 2003). É esta última fase a que está associada aos efeitos citopáticos típicos da infecção por este vírus, e como consequência, às suas manifestações clínicas (COSTA, 1999). Em infecções latentes, os monócitos CD14⁺ são um reservatório importante de vírus, e a estimulação alogênica prolongada destas células pode levar à reativação viral. Em contraste, durante uma infecção ativa, vários tipos de células são infectadas, predominantemente células endoteliais, neutrófilos e linfócitos (ROSEN, *et al*. 1998).

A infecção primária pelo CMV no TCTH ocorre quando um indivíduo soronegativo para o CMV se infecta com o vírus presente, na forma latente, em células de um doador soropositivo. A reativação viral ocorre quando o receptor de transplante, previamente infectado pelo CMV (soropositivo antes do transplante), sofre reativação do vírus latente após o transplante. A reinfecção ocorre quando um

indivíduo soropositivo recebe um órgão de um doador soropositivo apresentando uma cepa do vírus diferente daquela do doador e o vírus ativado é o procedente do doador (MAYA & AZULAY, 2000).

A infecção pelo CMV ocorre tipicamente entre a recuperação hematopoética (“*pega*”) e o D+120 pós-TCTH, determinando aumento significativo da morbidade e diminuição da sobrevida. Dentre as complicações clínicas associadas à infecção pelo CMV estão: pneumonia intersticial, doença gastrointestinal, retinite, pancitopenia, febre, demora na pega do enxerto (HOLLINGSWORTH, 2008).

Receptores de TCTH soropositivos para o CMV e receptores soronegativos com doador soropositivo estão sob risco de adoecimento e óbito pelo CMV e estratégias de controle devem ser adotadas nos primeiros 100 dias do TCTH. Tanto o uso de profilaxia como o tratamento preventivo com ganciclovir está indicado. A profilaxia visa inibir a reativação do CMV enquanto a estratégia preventiva visa inibir o adoecimento pelo CMV pelo tratamento precoce no caso de detecção de viremia pela vigilância viral (CASTAGNOLA, 2004)

O vírus Epstein-Barr (EBV) infecta principalmente linfócitos B e células epiteliais. É um vírus ubíquo, presente em cerca de 90% da população mundial, atingindo altas concentrações na saliva de indivíduos infectados, através da qual ocorre a transmissão (HISLOP, 2005).

A infecção tardia pelo EBV (adolescência e juventude) está associada ao desenvolvimento de mononucleose infecciosa em até 50% dos casos. Esta é uma imunopatologia benigna e autolimitada. No entanto, a infecção persistente pode associar-se ao desenvolvimento de neoplasias malignas de linhagem B (linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, PTLD) ou de células epiteliais (carcinoma de nasofaringe, carcinoma gástrico). Após infecção inicial, o vírus permanece latente nas células B, normalmente sem representar riscos para os indivíduos imunocompetentes. No entanto, em pacientes com imunidade comprometida, tanto a primo-infecção como a reativação ou reinfecção podem gerar graves complicações. A PTLD ocorre normalmente durante o primeiro ano pós-transplante (mais de 80% dos casos). Não obstante, pode também acontecer mais tarde, mesmo até 10 anos após o procedimento. A viremia/carga viral do EBV muitas vezes aumentam antes do aparecimento de uma lesão ou dos sintomas se tornarem evidentes, justificando o monitoramento de pacientes com vários fatores de risco (LANDOLFO *et al.*, 2003).

O diagnóstico e a monitorização da carga viral do EBV deve ser feita por PCR quantitativo (em tempo real) em pacientes com dois ou mais fatores de risco para reativação de EBV e de doença linfoproliferativa pós-transplante, a saber: população pediátrica, receptor soronegativo com doador soropositivo, transplantes não aparentados ou com disparidade de HLA, transplantes haploidênticos e uso de ATG ou depleção de células T. Em caso de aumento da carga viral, recomenda-se, se possível a redução da imunossupressão. Caso não haja resposta, a introdução de rituximab (uma dose de 375 mg/m²) pode prevenir a progressão para PTLN. Infusão de linfócitos do doador, a qual pode ser usada em associação com rituximab ou ser uma alternativa à ele. Não está recomendado o uso de profilaxia ou tratamento com aciclovir (SBTMO, 2012).

O HHV-6 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirine* e gênero *Roseolovirus*. As manifestações clínicas mais frequentes são: encefalite, pneumonia (BUCHBINDER, 2000) e atraso na pega do enxerto (ROSENFELD,1995). Ainda, como um grande problema para os receptores de TCTH está o fato de que o HHV-6 é suspeito de causar danos no endotélio vascular desses pacientes e esse processo pode levar à microangiopatia trombótica, que é uma complicação importante do TCTH (TAKATSUKA, 2003; MATSUDA, 1999). A infecção pelo HHV-6 também tem sido associada à supressão da medula óssea (mielossupressão). Viremia intermitente ocorre mesmo em hospedeiros imunocompetentes e a detecção de HHV-6 em amostras de sangue por PCR qualitativo tem pouco valor no diagnóstico de reativação (SBTMO, 2012).

O diagnóstico de reativação de infecção pelo HHV-6 deve ser feito por PCR quantitativo em amostras de sangue total, plasma ou soro (recomendação A). O diagnóstico de encefalite é feito pela detecção de HHV-6 por PCR qualitativo ou quantitativo em líquido, na presença de alterações neurológicas variadas e de imagens na ressonância magnética. Suspeita-se que o HHV-6 pode ser o causador da falha de enxertia quando se detecta reativação por este agente no período de neutropenia. No momento não se recomenda vigilância de HHV-6 em receptores de TCTH. Entretanto, é possível que receptores de transplante de sangue de cordão se beneficiem desta estratégia para introdução precoce de antiviral. O tratamento de doença pelo HHV-6 pode ser feito com o ganciclovir (5 mg/kg duas vezes ao dia) ou o foscarnet (60 mg/kg três vezes ao dia) por pelo menos três semanas (BUCHBINDER, 2000; SBTMO, 2012).

JUSTIFICATIVA

Durante a última década, a utilização de diferentes protocolos de TCTH haploidênticos vêm demonstrando resultados clínicos promissores. No entanto, esta modalidade de transplante ainda está sujeita a uma série de complicações precoces e tardias, sendo um procedimento com alta mortalidade.

O TCTH haploidêntico tem como característica uma intensa alorreatividade bidirecional e um retardo na reconstituição imunológica, resultando em um aumento de infecções oportunistas e reativações de vírus latentes. Nesse sentido, estudos comparativos sobre a recuperação imunológica e o acometimento de infecções virais entre as modalidades de TCTH alogênico HLA-idêntico e haploidêntico ainda são escassos.

Sabe-se que no TCTH alogênico, os condicionamentos e profilaxias imunossupressoras colocam o paciente em risco de infecção e reativação de diferentes vírus como CMV, EBV entre outros, sendo este risco de particular importância nos transplantes não aparentados e haploidênticos. Torna-se importante, portanto, analisar detalhadamente a reconstituição das diferentes populações celulares após o TCTH alogênico e comparar suas cinéticas nas modalidades haploidêntico e HLA-idêntico (aparentado ou não aparentado), e quais são os fatores relacionados ao transplante que influenciam significativamente a reativação e infecção virais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a recuperação de populações imunes de pacientes submetidos ao transplante haploidêntico comparado ao transplante HLA-idêntico e verificar como este processo influencia nos eventos de infecções e reativações virais.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar imunofenotipicamente e comparar as populações celulares presentes no sangue periférico dos pacientes submetidos ao TCTH haploidêntico e HLA-idêntico em diferentes tempos após o transplante;
- Avaliar a relação entre os achados da recuperação imunológica e a ocorrência de infecções e reativações virais em diferentes tempos após o transplante.
- Realizar associações entre a recuperação imunológica pós TCTH, os eventos de infecção/reativação viral e a presença de DECH aguda.

4 METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório de Imunologia, nas dependências do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar (INCA), no Rio de Janeiro. A seleção dos pacientes para este estudo foi realizada durante o período de 2017 a 2019. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa (CEP) do INCA, CAAE 53571116.4.0000.5274. Foram adotadas medidas que asseguram a confidencialidade e a privacidade dos pacientes e todo o material do estudo só foi utilizado após o Termo de consentimento Livre e esclarecido (TCLE) ter sido assinado pelos pacientes submetidos a Transplante alogênico de CTH.

4.1 Pacientes e amostras

Neste estudo, foram coletadas 186 amostras de sangue periférico obtidas por punção venosa e anticoagulada com EDTA, de 31 pacientes submetidos a TCTH alogênico no CEMO/INCA. Como critério de inclusão desse estudo, foram aceitos pacientes submetidos TCTH alogênico de MO e SP, sem importar doença de base; eles sofreram regimes de condicionamento mieloablativo ou de intensidade reduzida. Os pacientes foram acompanhados desde o dia D-8 pré-transplante, D+30, D+60, D+90, D+120, D+180 e até o D+360 pós-transplante. Foram excluídos pacientes submetidos a TCTH autólogo.

4.2 Obtenção dos dados clínicos pacientes

Para a obtenção dos dados clínicos foi realizado a coleta de informação através dos prontuários clínicos de cada paciente, as quais foram coletadas todas as variáveis clínicas e biológicas necessárias para este estudo. As informações coletadas foram: doença de base, o tipo de transplante, idade, sexo, fonte de células utilizadas para o TCTH, HLA do paciente e doador, regime de condicionamento, regime de profilaxia da DECHa, dia de acometimento da DECHa, órgão acometido pela DECHa, estadiamento da DECHa, regime de profilaxia para infecções virais, tratamento utilizado em caso de infecção viral, tipo de infecção e dia do óbito e causa do óbito.

4.3 Coleta de sangue periférico

As coletas de sangue dos pacientes submetidos ao transplante foram realizadas nos dias D-8, D+30, D+60, D+90, D+120, D+180 e D+360. Uma alíquota deste sangue (2 ml) foi separada para o estudo da recuperação imunológica pela técnica de citometria de fluxo e o restante da amostra foi processado para a obtenção de células mononucleares e plasma que foi tratado com inibidor de protease e posteriormente armazenado para estudos futuros em biorrepositório específico.

4.3.1 Processamento de células

O sangue coletado de cada paciente nos diferentes dias foi utilizado para a obtenção das células mononucleares. As amostras foram submetidas a uma centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (Sigma®), na proporção 1.1 por 30 minutos. Após centrifugação, o anel interfacial enriquecido em células mononucleares foi cuidadosamente transferido para novo tubo cônico de 15 ml e submetido a centrifugação de 1.200 rpm por 3 a 5 min. O concentrado de células foi lavado duas vezes com 1 ml de solução de lise de Hemácias (10 mM Tris pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl). Após disso, a amostra foi submetida a nova centrifugação (1.200 de 3 a 5 min) e seu sobrenadante descartado até obter um pellet de células que posteriormente foi armazenado em freezer -80°C.

4.4 Estudo imunofenotípico por citometria de fluxo

As amostras dos pacientes pré e pós-transplante alogênico de CTH nos dias D-8, D+30, D+60, D+90, D+120, D+180 e D+360 foram estudadas por citometria de fluxo para a avaliação da recuperação imunológica, mediante a utilização de anticorpos monoclonais (AcMo) (Becton e Dickinson Biosciences, BD). O painel de anticorpos utilizados está descrito na tabela 4.1.

As marcações foram realizadas adicionando anticorpos (de acordo com prévia titulação) a 100 µl da amostra de sangue periférico, em tubos de 1,5 ml. As células foram incubadas com os anticorpos durante 15 min no escuro a temperatura ambiente. Após este procedimento, foram adicionados 2 ml da solução de lise de hemácias comercial *BD FACS Lysing solution* (1x) (BD), seguido de incubação durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.700 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após

esse procedimento, foi adicionado em cada tubo, 2 ml de PBS (1X) (Sigma-Aldrich, Alemanha), seguido por centrifugação a 1.700 rpm por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspendidas em PBS (1x) para a leitura no citometro de fluxo (FACSCanto II) onde adquiriu-se 100.000 eventos totais. O software de analise utilizado foi o *Infinicity* (Cytognos, Espanha).

Tabela 4.1: Anticorpos utilizados no estudo de recuperação imunológica e suas marcações.

Painel Pre- Pós- TCTH							
FITC	PE	PERCP	PECy7	APC	APCH7	V450	V500
CD45	CD38	CD19	-		-	-	-
CD45RO	CD8	CD4	CD45RA	CD3	CD38	-	-
TCR α - β	CD8	CD4	TCR γ -D	CD3	-	-	-
CD27	CD26	CD4	CD19	CD28	CD3	-	-
CD56	CD16	CD3	-	-	-	-	-
CD27	CD8	CD4	CD19	CD28	CD3	-	CD45

4.4.1 Análises imunofenotípicas

A análise dos dados de citometria de fluxo foi realizada no software *Infinicity*, e incluiu uma análise global da recuperação imunológica dos pacientes. Desta forma, a análise das fluorescências das diferentes combinações de anticorpos monoclonais permitiu identificar os vários perfis fenotípicos celulares e estabelecer os *gates* eletrônicos para calcular a frequência das populações celulares selecionadas, tais como linfócitos T totais (CD3⁺), linfócitos T *helper* ou auxiliares (CD3⁺/CD4⁺) e Linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), linfócitos B (CD19⁺CD20⁺), células T de memória (CD4⁺/CD8⁺/CD45RO⁺) e efetoras (CD4⁺/CD8⁺CD45RA⁺), o TCR α β ⁺CD4⁺CD8⁺, o TCR γ δ CD4⁺CD8⁺, células T com co-estimuladores (CD28⁺CD8⁺), (CD28⁺CD4⁺), células NK totais (CD56⁺), NK ativadas (CD56⁺CD16⁺) e NKT (CD56⁺CD3⁺) entre outras. Exemplos das análises das subpopulações celulares no sangue periférico são apresentados na Figura 4.1.

Os valores absolutos das diversas contagens celulares, foram calculados através do produto das frequências celulares obtidas pelo valor da contagem de linfócitos/ μ l ou outras populações celulares no sangue periférico e a leucometria (leucometria x número de frequência da população celular /100). Com os valores

obtidos em porcentagem e o número absoluto foi realizado um banco de dados no software Excel, para posterior análise estatística.

Como grupo controle foi analisado um conjunto de amostras de SP proveniente de indivíduos saudáveis, visando estabelecer os valores de referência, que foram usados para comparar com os resultados de reconstituição imunológica dos pacientes submetidos a TCTH alogênico.

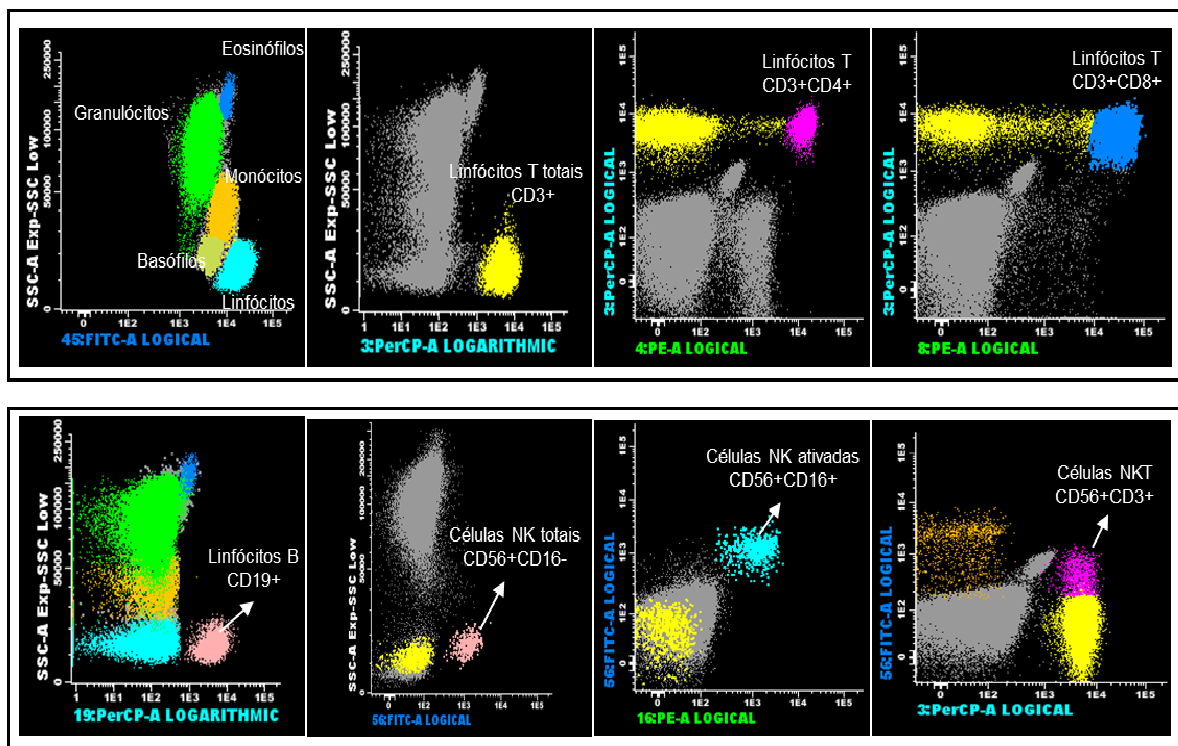


Figura 4.1: Gráficos de ponto ilustrativos das diferentes subpopulações celulares encontradas no sangue periférico. Entre elas Linfócitos T CD3+, CD3+ CD4+, CD3+CD8+, Linfócitos B CD19+, NKCD56+, NK ativada CD56+CD16+, NKT CD56+CD3+.

4.5 Avaliação das infecções e reativações virais

A avaliação das infecções e reativações virais foram feitas no Laboratório de Oncovirologia do CEMO, de acordo com os procedimentos operacionais padrão (POPs) desse laboratório.

O DNA foi extraído da fração plasmática do SP, utilizando os kits Qiamp Blood mini kit (Qiagen) segundo as recomendações do fabricante.

Inicialmente, foi realizada uma reação multiplex, contendo oligonucleotídeos para a detecção de 7 herpesvírus (HSV-1/2, CMV, EBV, VZV, HHV-6, HHV-7) em uma única reação. A sensibilidade da detecção foi de 5-25 cópias/ml de plasma, variando de acordo com o vírus. Seguidamente, foram realizadas reações de nested-PCR (PCR aninhada) com primers específicos para a detecção dos vírus

HHV-8, adenovírus, poliomavírus BK e poliomavírus JC. Todas as reações contiveram controles positivos e negativos adequados.

Em caso de cistites hemorrágicas, as reações foram realizadas em DNA extraído de plasma e urina, em paralelo.

Quando a primeira linha de diagnóstico mostrou a presença de CMV, EBV e HHV-6, foram realizadas reações de PCR quantitativas em tempo real (qPCR) para confirmação e quantificação da viremia.

As reações de qPCR foram realizadas em uma plataforma Vii7 (Applied Biosystems, Life Technologies), em duplicata, usando sondas de hidrólise (TaqMan®) e dois primers específicos para cada alvo, CMV, EBV e HHV-6. Em cada ensaio de qPCR foram incluídos um conjunto de controles positivos (calibrador interplaca), negativos (NTC), assim como um conjunto de diluições seriadas em base log10 de plasmídeos contendo o segmento viral de interesse. A quantificação foi realizada por calibração reversa do resultado da amostra sobre a reta construída a partir dos resultados da amplificação das diluições seriadas. A quantidade de genomas virais foi expressa em número de cópias / ml de plasma. O limite de sensibilidade dos ensaios foi de 5 cópias/ml de plasma e o limite de quantificação foi de 25 cópias / ml de plasma.

O evento ou episódio de reativação viral foi definido como o período entre a primeira detecção do vírus e a última detecção consecutiva do vírus, seja esta acompanhada de viremia quantificável ou não. O valor de quantificação escolhido para análise foi o maior valor observado durante o episódio (pico de viremia). No mesmo paciente, dois eventos foram considerados independentes quando separados por pelo menos 15 dias e 2 PCRs negativas consecutivas.

4.6 Análise estatística

As análises comparativas foram realizadas através da junção dos dados por doença de base, tipo de transplante alogênico aparentado (AP), não aparentado (NAP) e ou haploidêntico (haplo). O menor nível de significação estatística aceito foi de 95%, ou seja, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). As análises estatísticas e as representações gráficas foram realizadas com auxílio dos softwares SPSS versão 20 e GraphPad Prism 6.02 (GraphPad software Inc., EUA). A dispersão dos dados em relação à média foi representada graficamente na forma de desvio padrão (DP) e a dispersão em torno à mediana, como desvio interquartil. As diferenças entre medianas foram

avaliadas pelos testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. As diferenças entre proporções foram realizadas pelos testes de Fisher ou Chi-quadrado. As análises de tempo-para-evento foram realizadas pelas curvas de Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi feita através do teste log-rank

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do grupo de estudo

No período de fevereiro de 2017 a janeiro de 2019 foram realizados 80 TCTH-alogênico na unidade de transplante CEMO do INCA, dos quais 63 foram HLA-idêntico e 17 haploidênticos. Dentre esses 80 pacientes foram estudados e acompanhados clínica e imunologicamente 31 pacientes. Desses, 7 (22%) receberam TCTH aparentado (AP), 12 (39%) TCTH não-aparentado (NAP) e 12 (39%) TCTH-haploidêntico conforme Figura 5.1.

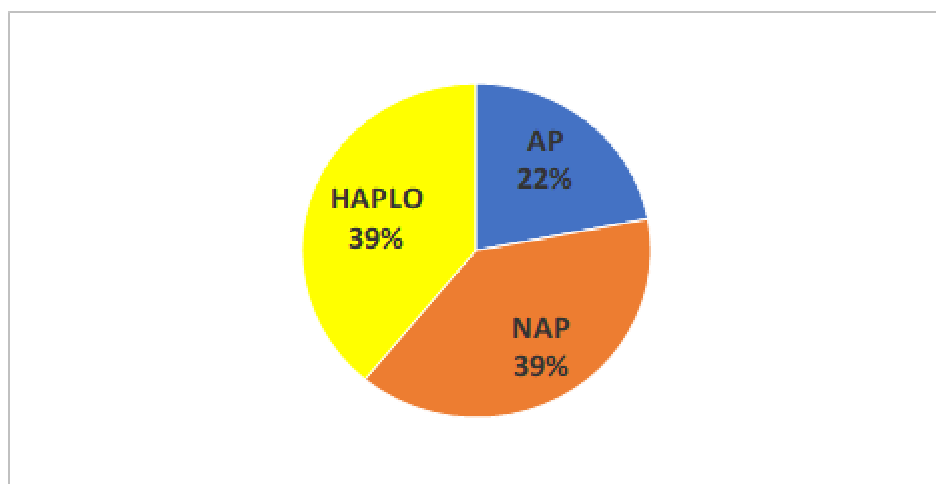


Figura 5.1: Classificação dos casos estudados por tipo de TCTH.

As características demográficas e clínicas dos pacientes e transplantes estão resumidas na Tabela 5.1. Vinte um dos 31 pacientes eram do sexo masculino e 10 do sexo feminino, a idade mediana dos pacientes submetidos a TCTH-AP foi de 39 anos (faixa: 1 a 54 anos), dos submetidos a TCTH-NAP, 19 anos (faixa: 4 a 58), e dos pacientes submetidos a TCTH-haplo, 27 anos (faixa: 6 a 65 anos). Em relação à doença de base no momento do TCTH, 24 pacientes tinham o diagnóstico de leucemia aguda, sendo onze com leucemia linfóide aguda (LLA) e 12 com leucemia mieloide aguda (LMA), quatro pacientes tiveram o diagnóstico de anemia aplástica

(AA), três de síndrome mielodisplásica (SMD) e um com diagnóstico de Mielofibrose (MF).

Tabela 5.13: Características dos pacientes e transplantes

Variáveis	AP	NAP	Haplo	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N= 31
Idade (mediana, faixa - anos)	39 (1-54)	19(4-58)	27(6-65)	
Sexo				
Masculino	4 (57)	8 (67)	9 (75)	21
Feminino	3 (43)	4 (33)	3 (25)	10
Doença de base				
AA	0 (0)	2(17)	2 (17)	4
LMA	5 (71)	6 (50)	1 (8)	12
LLA	1(14)	4 (33)	6(50)	11
SMD	0 (0)	0 (0)	3 (25)	3
MF	1(14)	0 (0)	0 (0)	1
Regime de Condicionamento				
Mieloablativo	5 (71)	12 (100)	9 (75)	26
Intensidade Reduzida	2(29)	0 (0)	3 (25)	5
Fontes de Células Tronco				
MO	7 (100)	10 (83)	12 (100)	29
SP	0 (0)	2 (17)	0 (0)	2
Estadiamento da DECH				
I-II	0 (0)	3 (25)	1 (8)	4
III-IV	1(14)	1 (8)	2(17)	4
Sem DECH	6 (86)	0 (0)	9 (75)	15
Infecção Viral / Reativação viral				
Sim	4 (57)	9 (75)	8 (67)	21
Não	3 (43)	3 (25)	4 (33)	10
Óbito				
Sim	1 (14)	3 (25)	4 (33)	8
Não	6 (86)	9 (75)	8 (67)	23
Total	7(22)	12 (39)	12 (39)	31

Legenda: LLA: Leucemia Linfóide Aguda, LMA: Leucemia Mieloide Aguda, AAS; Anemia Aplástica, SMD: Síndrome Mielodisplásica, MF: Mielofibrose, DECH: Doença do Enxerto contra Hospedeiro, SP: Sangue Periférico, MO: Medula Óssea.

A fonte de CTH foi MO em 7/31 paciente com doador AP, 10/31 com doador NAP, 12/31 com doador haploidêntico. Os restantes dois pacientes (NAP) receberam SP como fonte de CTH.

Vinte e seis dos 31 pacientes submetidos ao TCTH-alogênico receberam condicionamento mieloablativo e cinco dos pacientes receberam condicionamento de intensidade reduzida. Houve um maior número de condicionamento mieloablativo no grupo de pacientes NAP (100%), em relação ao observado no grupo

haploidêntico (75%) e aparentado (71%). Isso deve-se ao fato de que, em TCTH HLA-idêntico não aparentado, existindo um maior risco de desenvolver DECH quando comparado com o grupo aparentado HLA-idêntico e haploidêntico (AZEVEDO, 2010).

A profilaxia mais comum utilizada para DECH foi uma combinação de ciclosporina (CSA) e metotrexato (MTX) em 14 dos pacientes, sete dos pacientes utilizaram uma combinação de CSA, MTX e Micofenolato Mofetil (MMF), quatro pacientes utilizaram uma combinação de MTX e tacrolimus (FK506), três utilizaram CSA, MTX e FK, em apenas dois dos pacientes foi utilizada uma combinação de CSA e FK, um paciente utilizou uma combinação de CSA, MMF e ciclofosfamida (Cy).

Dos 31 pacientes incluídos neste estudo, 8 (26%) desenvolveram DECH aguda (DECHa), 50% com DECHa graus I-II e 50% com DECHa graus III-IV. A frequência de DECH grave (III/IV) foi 1/1 no TCTH-AP, 1/3 no TCTH-NAP e 2/3 no TCTH-haplo. A mediana de dias para a ocorrência de DECH foi 37 dias (17-130 dias).

5.2 Reconstituição imunológica

Com o objetivo de avaliar a reconstituição imunológica nos pacientes após as diferentes modalidades de TCTH, quantificamos o valor absoluto (células/ μ L) e percentual das diversas subpopulações celulares do sangue periférico no acompanhamento pré e pós-transplante, mediante análise por citometria de fluxo, conforme descrito anteriormente. Os valores absolutos foram calculados a partir dos valores da leucometria obtidos em contador automático.

O sangue periférico dos pacientes submetidos ao transplante foi analisado de acordo com o perfil das populações celulares presentes em comparação com os valores obtidos no grupo controle. Este grupo esteve composto por 20 indivíduos saudáveis (mediana de idade 33,5 anos, faixa 18-58 anos; 7 homens e 13 mulheres) que doaram voluntariamente para este estudo

Na Tabela 5.2 são mostrados os valores absolutos e percentuais obtidos a partir da análise das populações celulares no sangue periférico de 20 doadores normais.

Tabela 5.2: Valores de referência das populações celulares do sangue periférico em doadores saudáveis (grupo controle)

População/ μL	% (Média)	Média (células/uL)	\pm DP	Mediana (células/uL)	Mínimo	Máximo
Granulócitos	48	3560,9	1472,9	3490,5	1395,7	6914
Linfócitos Totais	40	2944,8	1162,9	2858,8	1354,7	6263,9
Monócitos	6	430,2	218,8	446,6	28,53	704,5
Eosinófilo	4	285	170,8	282,1	68,3	627,2
Linfócitos T CD3+	28	2097	831,8	1920	988	4293,4
LT CD3+, CD4+	16	1174,6	498	1007	515,5	2446
LT CD3+, CD8+	10	716,7	333	665,12	352,34	1520
CD45RA+CD4+	9	673,5	406,2	559	220,7	1623
CD45RA+CD8+	7	504,8	239,75	484,1	14,3	1051
CD45RO+CD4+	1	112,88	72,7	99,6	27	334
CD45RO+CD8+	2	152	125,8	114,51	3,90	400
Linfócito B CD19+	10	511,6	299,5	401,5	215,4	1500
NK CD3- CD16+CD56+	4	315	133,4	279,5	151,5	605,9
NKT CD3+56+	3	233,3	188,9	183,2	20,9	738,6

Fonte: Elaboração própria

5.3 Cinética de reconstituição dos Granulócitos

Todos os pacientes recuperaram a contagem granulocítica até o D+30. De fato, a pega do enxerto, definida como a manutenção de uma contagem absoluta de 500 neutrófilos/ mm^3 ocorreu entre os dias 12 e 23 pós-transplante (mediana 17,5 dias) no grupo total de pacientes. No D+30 após-transplante, o número de granulócitos aumentou em relação ao pré-transplante nos três grupos de pacientes (NAP, AP e Haplo), alcançando a faixa de normalidade em relação ao grupo controle (media 48% e 3560,9 células/uL). Após o D+30, os valores se mantiveram em torno dos valores normais em todo o período analisado, no entanto, nos TCTH-haploidêntico teve uma queda no D+90 em relação aos grupos de pacientes AP e NAP, sem significância estatística (Figura 5.2).

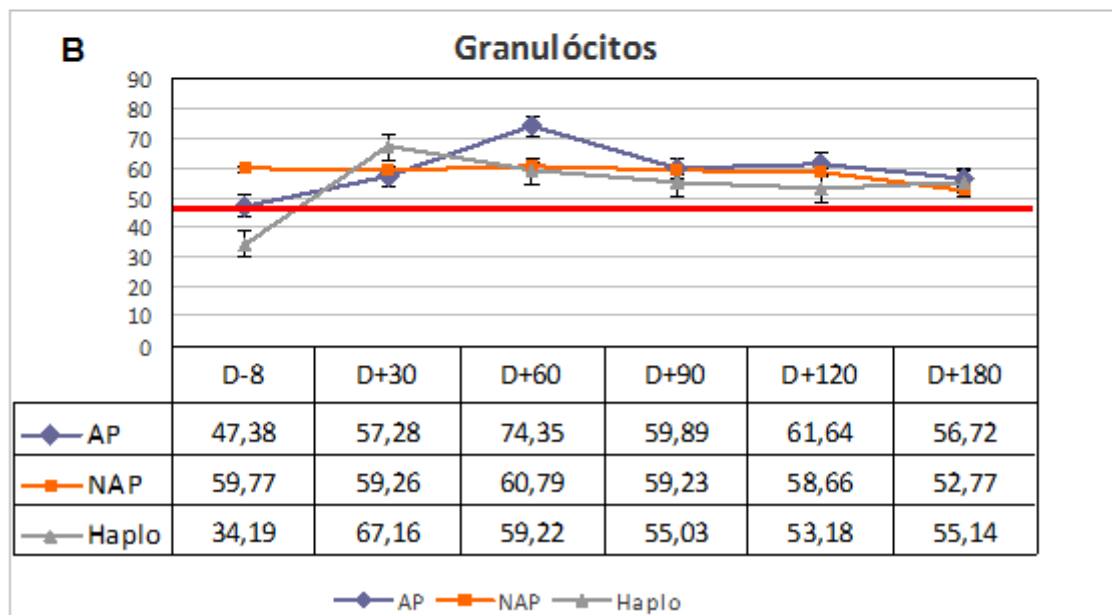
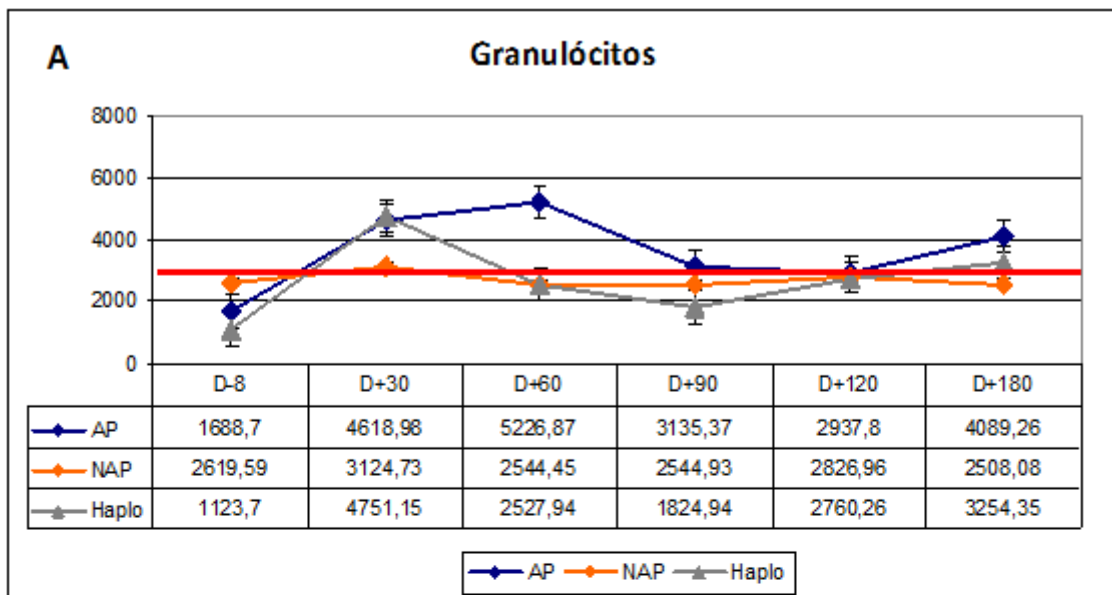


Figura 5.2: Reconstituição de granulócitos pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de granulócitos de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de granulócitos de cada grupo em relação às outras populações celulares do SP (, monócitos, eosinófilos e basófilos). A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo controle.

5.4 Cinética de reconstituição dos Monócitos

Os valores absolutos e percentuais dos monócitos se mantiveram em torno dos valores normais, com exceção dos pacientes com transplante haploidêntico, em que os valores absolutos pré-transplante estiveram diminuídos em ~50%, e houve um aumento provavelmente compensatório para o D+30 (Figuras 5.3).

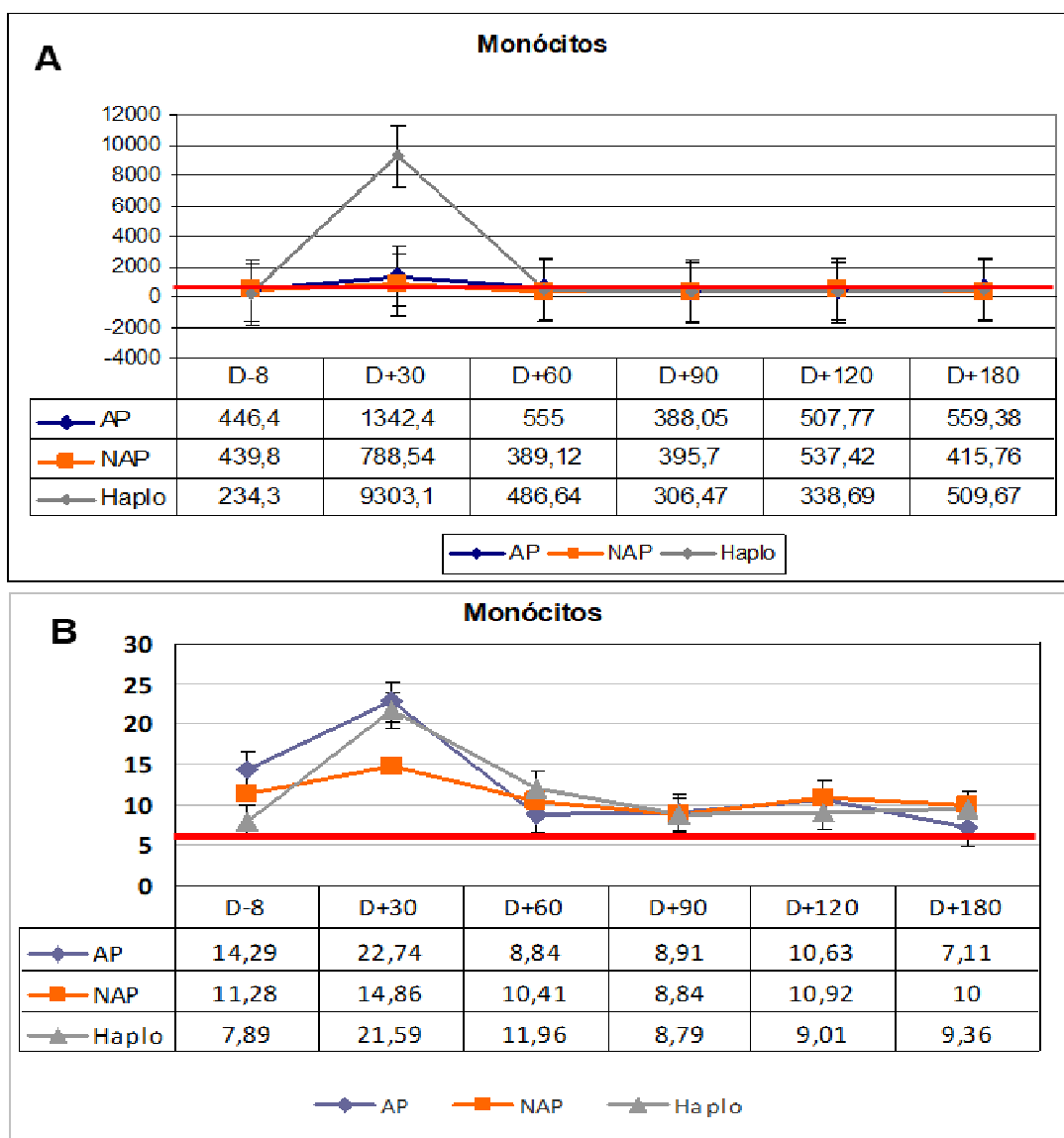


Figura 5.3: Reconstituição de monócitos pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de monócitos de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de monócitos de cada grupo de transplante.

5.5 Cinética da reconstituição de linfócitos totais

No período inicial após o TCTH uma linfopenia intensa ocorreu em todos os pacientes, que pode ser observada como um baixo número de linfócitos totais no sangue periférico (Figura 5.5). Como descrito, a enxertia da medula óssea ocorreu em todos os pacientes no primeiro mês pós-transplante. A partir dessa data, houve a reconstituição das subpopulações celulares do sistema imune e hematopoético a partir das CTHs infundidas ou residuais no paciente. A contagem de linfócitos totais foi obtida para cada paciente e cada tempo de avaliação pela análise da frequência de células no *gate* com FSC e SSC compatível com linfócitos, marcadas com o marcador de linhagem hematológica, CD45 (CD45+). Até o dia avaliado (D+180) os

valores absolutos dos linfócitos totais dos três grupos estudados permaneceram diminuídos em comparação ao grupo controle que teve uma média de 2944 células/ul. Os valores absolutos e percentuais do TCTH haplo diminuiram notavelmente no D+30, com significância estatística em relação aos grupos de pacientes AP e NAP ($p= 0,005$ e $0,011$; teste de Kruskal-Wallis) (Figura 5.4). Nos D+120 e D+180 os valores do transplante NAP e haplo não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p>0,05$). Por sua vez, os valores do TCTH AP aumentaram notavelmente entre os D+120 e D+180, em relação aos grupos de pacientes NAP e haplo, mas sem significação estatística.

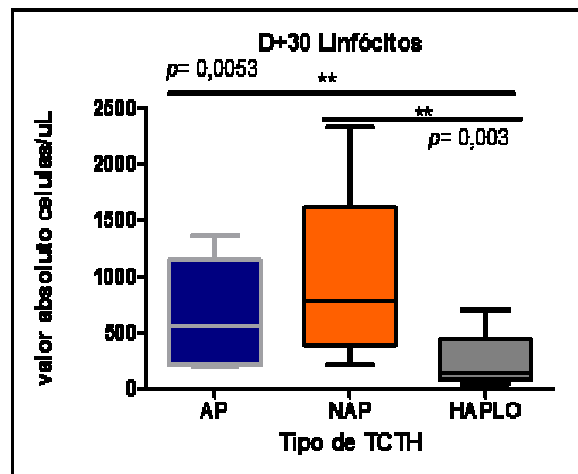


Figura 5.4: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos totais no D+30 nas três modalidades de transplante. O transplante haploidêntico teve valores significativamente menores de linfócitos totais em relação aos outros dos tipos de transplante ($p= 0.0053$), e em relação ao transplante NAP ($p= 0.003$). A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. $**p<0,01$; Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis).

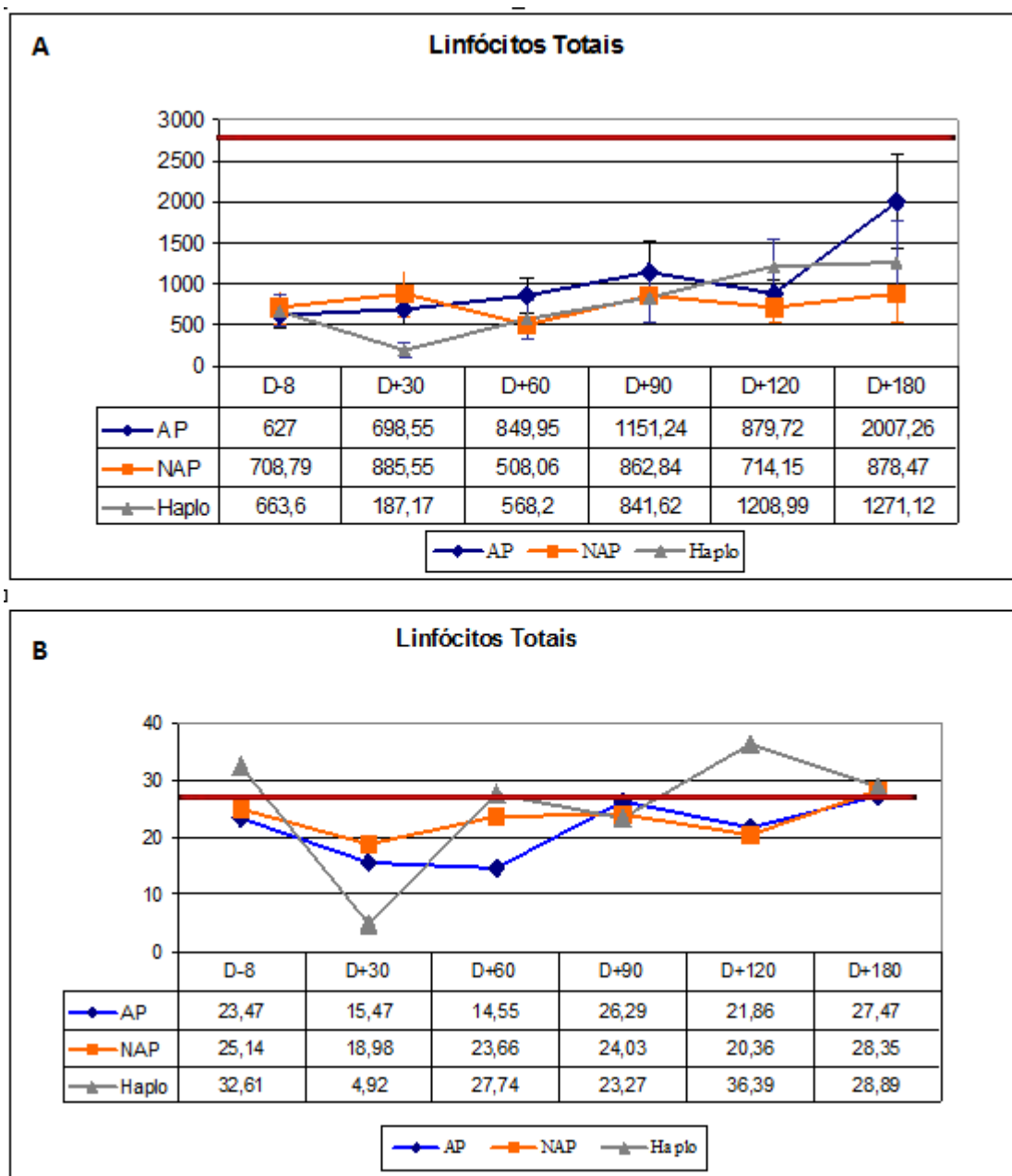


Figura 5.5: Reconstituição de linfócitos totais pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos totais de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de linfócitos totais de cada grupo em relação às outras populações celulares do SP (granulócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos). A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo controle.

5.6 Relação entre Linfócitos e Monócitos

Uma vez que a proporção entre linfócitos e monócitos (PLM) é um indicador clínico em vários tipos de cânceres e condições não neoplásicas (LU *et al*; 2017; TAN *et al*, 2018; HUANG *et al*, 2018; LI *et al*, 2019) e pode ser usado como marcador de inflamação junto com outros indicadores no contexto de intervenções cirúrgicas (PAN *et al*, 2018), realizamos uma análise dos índices PML nas diferentes

modalidades de transplante. Como esperado a partir do comportamento da população linfocitária no D+30 em todas as modalidades, a PLM foi <1 neste ponto do acompanhamento (Figura 5.6), sendo extremamente baixa (0,08) no transplante haploidêntico, devido a linfopenia combinada com monocitose observadas no D+30 dessa modalidade ($p=0,04$; Teste de Kruskal-Wallis).

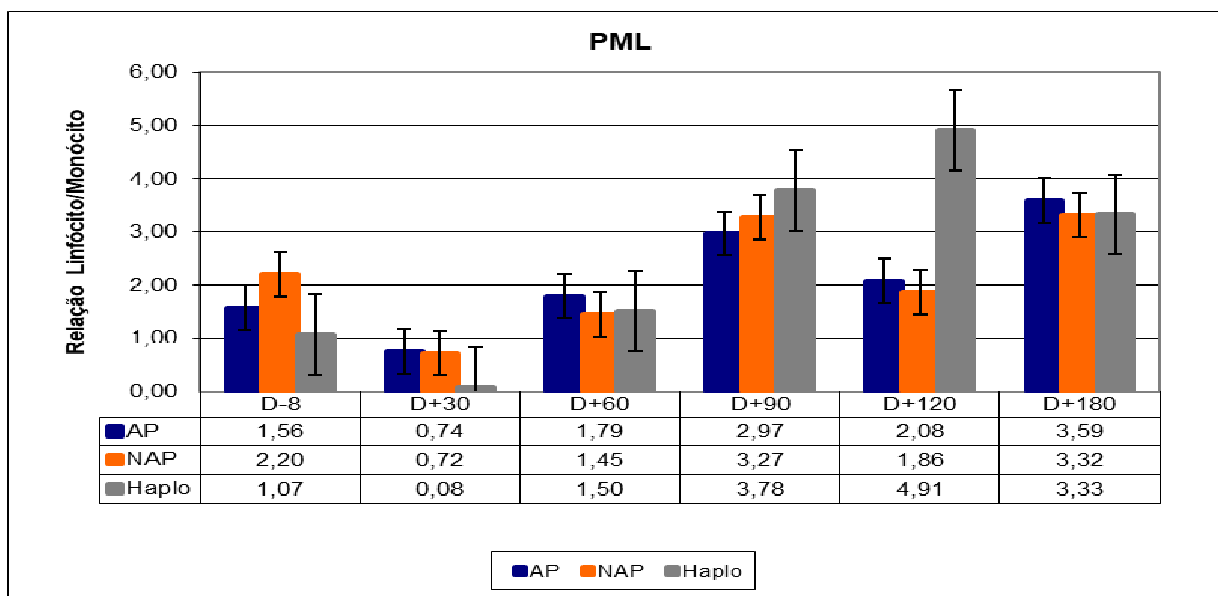


Figura 5.6: Proporção linfócito/monócito nos TCTH alogênicos. Os valores na tabela representam a proporção entre valores absolutos de linfócitos/monócitos em cada grupo terapêutico, nos diferentes pontos do acompanhamento.

Quando os casos foram categorizados de acordo com a média aritmética das PLM no D+30 (0,51), foi observada uma diferença significativa entre as modalidades de transplante, em que os transplantes AP tiveram similar proporção, enquanto que 91% dos pacientes submetidos a transplante NAP exibiram valores PLM maiores que a média, e 88% dos haplo tinham valores menores ($p=0,002$; teste de χ^2).

5.7 Reconstituição de linfócitos NK, T e B

Nesta parte do trabalho, foram avaliados aspectos básicos da reconstituição imunológica pelos números de células NK ($CD56^+CD16^-$), linfócitos T totais e subpopulações de linfócitos T ($CD3^+$ totais, $CD4^+$ *helper* e $CD8^+$ citotóxico), assim como linfócitos B $CD19^+$.

As células NK $CD56^+/CD16^+$ e/ou $CD3^+$ foram as primeiras células a exibir uma cinética crescente após o TCTH-alogênico, seguidas pelos linfócitos T $CD3^+CD8^+$, linfócitos T *helper* $CD3^+CD4^+$ e finalmente, os linfócitos B $CD19^+$.

5.8 Reconstituição de células NK

Grandes linfócitos granulares com marcadores *Natural Killer* (NK) ($CD3^-/CD16^+CD56^+$) representam uma população importante no pós-transplante.

A quantidade de células NK $CD56^+CD16^-$ em pessoas saudáveis varia entre 5 e 30%. Entretanto, neste estudo, não conseguimos quantificar as células NK totais para todos os controles, e, portanto, tomamos como referência valores normais referidos na literatura de contagens absolutas de 60 a 590 células/ μ L e valores percentuais de 4 a 26% (SEGGEWIS, 2010). No pré-transplante (D-8), os valores absolutos observados das células NK foram inferiores aos valores observados no pós-transplante, porém dentro da faixa de normalidade. Em termos percentuais, os valores se encontraram ligeiramente abaixo da faixa de normalidade. Isto indica que esta população está potencialmente afetada pelo condicionamento, mas aponta para uma capacidade de reconstituição rápida destas células, uma vez que para o D+30 nos três tipos de transplante já haviam se recuperado os valores normais. No D+60 houve uma diminuição destas células nas três modalidades de transplante, sendo os NAP aqueles que exibiram uma cinética decrescente mais brusca. A partir do D+90, os valores observados no transplante haplo tiveram uma tendência ligeira, mas constantemente decrescente (Figura 5.7). Não houve diferenças estatísticas entre os diferentes transplantes nos tempos de acompanhamento avaliados ($p > 0.05$).

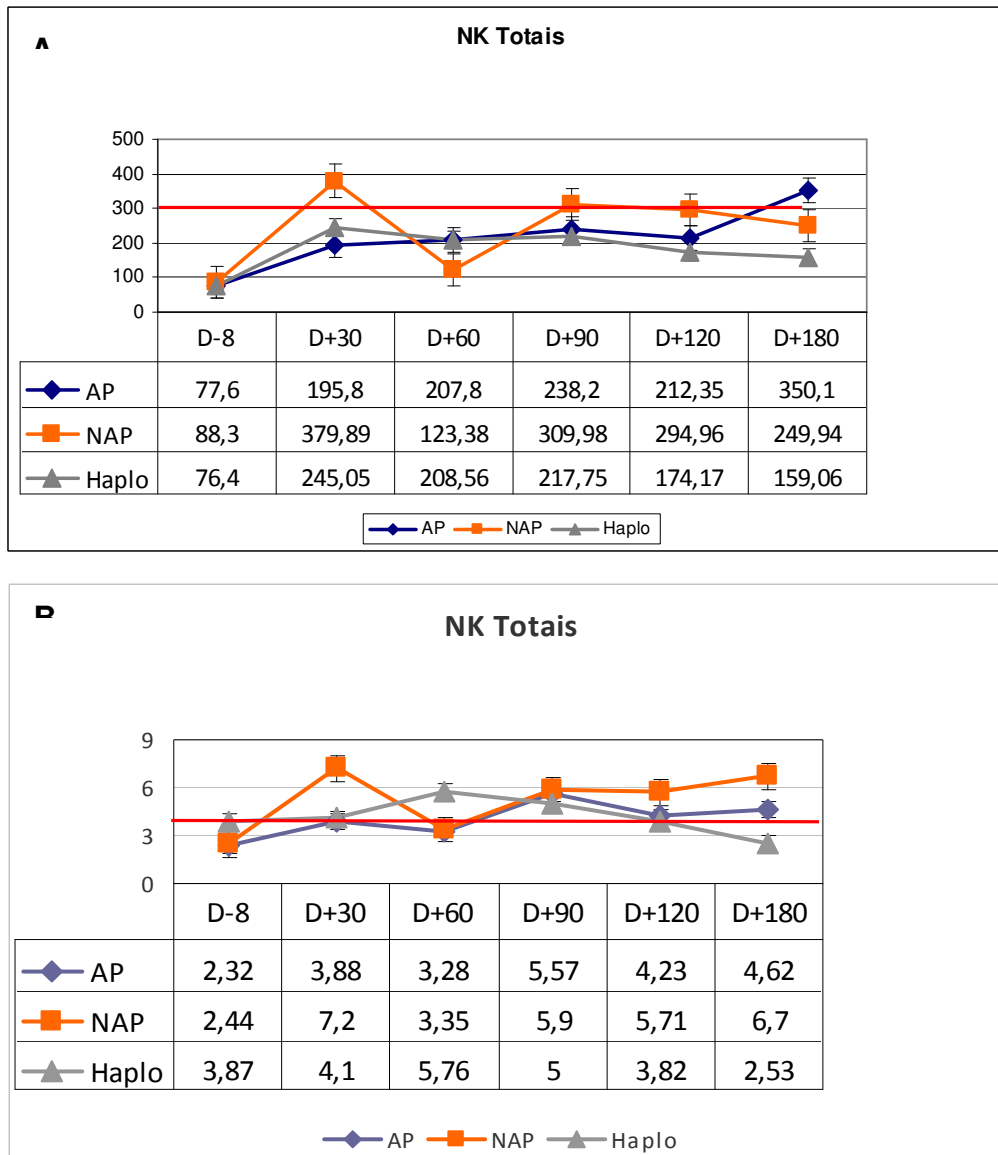


Figura 5.7: Reconstituição de células NK totais pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) das células NK totais de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) das células NK totais de cada grupo. A linha vermelha corresponde aos valores inferiores da faixa de normalidade encontrado na literatura (SEGGEWIS,2010).

Em relação às células NK ativadas CD56⁺CD16⁺, a média dos valores absolutos nos controles saudáveis foi 315 células/uL e a média das porcentagens foi 4%. As tendências de recuperação foram similares às NK totais nos primeiros 2 meses pós-transplante. A partir do D+60 pode-se observar uma recuperação continuamente ascendente no grupo de pacientes com TCTH-NAP, tanto a nível absoluto quanto percentual; comparado com os valores do TCTH-haplo que mostrou os menores níveis. Já os valores do TCTH-AP aumentaram notavelmente no D+120 (Figura 5.8).

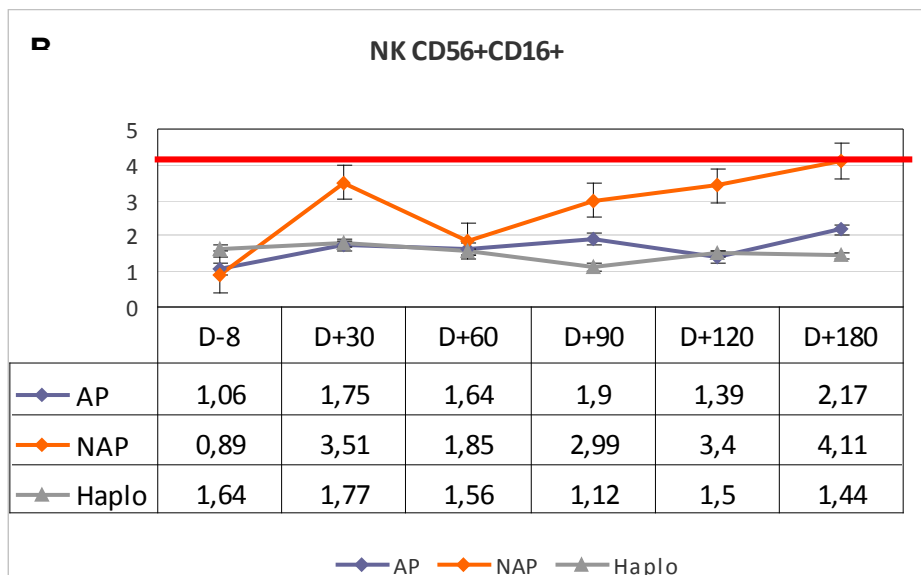
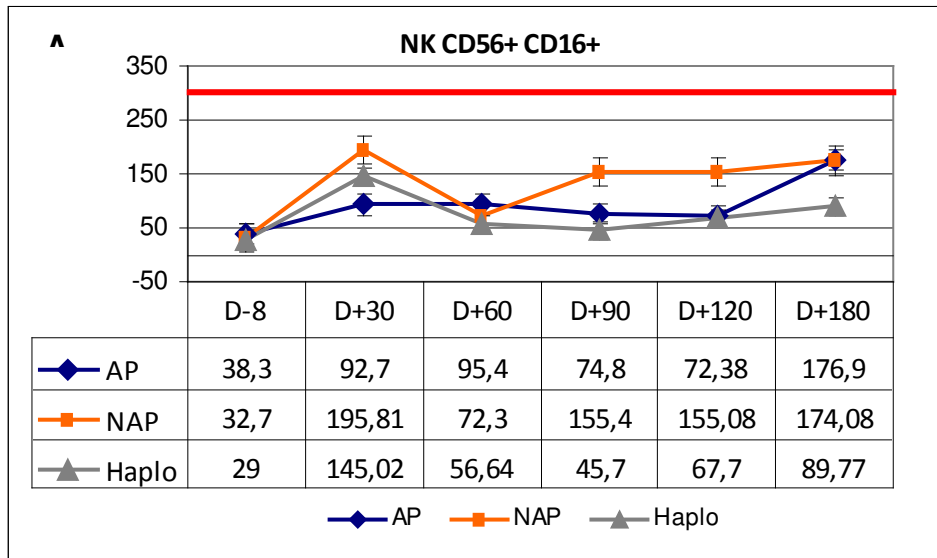


Figura 5.8: Reconstituição das células NK ativadas pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) NK ativadas CD56+ CD16+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) das células NK ativadas CD56+ CD16+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo controle. Apesar das tendências, não houve diferenças significativas entre os grupos.

5.9 Reconstituição de células NKT

As células NKT são uma população distinta de células T expressando um TCR invariante e um conjunto de moléculas de superfícies características das células NK. Neste trabalho, a população NKT foi identificada pela expressão das moléculas CD56+ e CD3+. O valor médio das células NKT nos controles saudáveis foi 233,3 células/ μ L, representado em média 3%. Em termos de valor absoluto, os

transplantes NAP e haplo aumentaram de maneira semelhante para o D+30, em comparação com o transplante AP, cuja cinética foi mais lenta, tomando até o D+60 para alcançar o seu valor máximo. Os valores absolutos atingiram seus valores mínimos entre os D+90 e D+120 (Figura 5.9). Em termos percentuais, houve um aumento relativo nos três tipos de transplante para o D+30. No D+60 os valores percentuais das células NKT diminuíram e se estabilizaram posteriormente em torno de 1% (Figura 5.10). Encontrou-se uma diminuição significativa no D+60 ($p= 0,022$) no grupo NAP em relação aos pacientes submetidos a transplante AP e haplo (Figura 5.9).

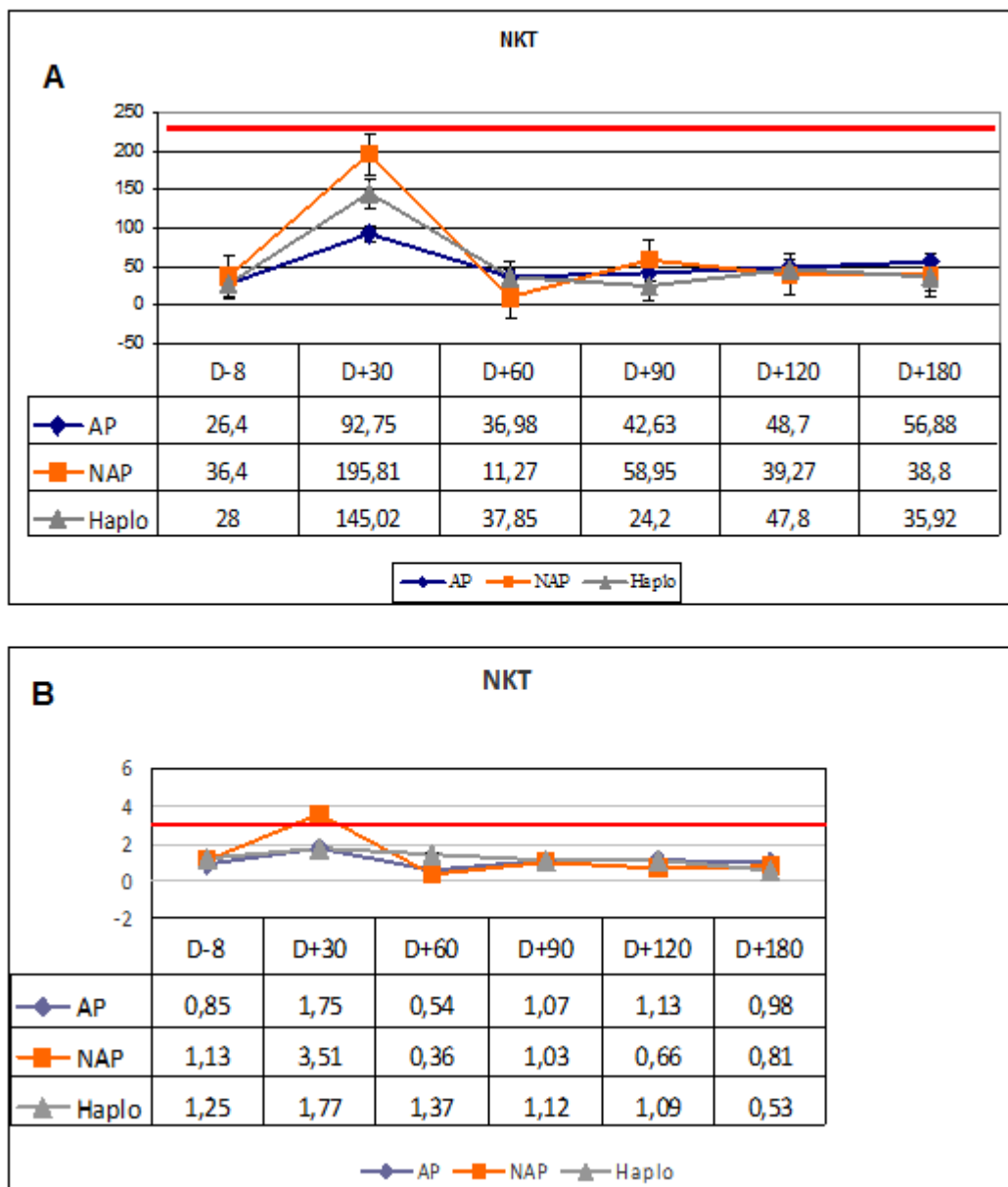


Figura 5.9: Reconstituição de células NKT pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) NKT CD56+CD3+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) das células NKT CD56+ CD3+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo controle.

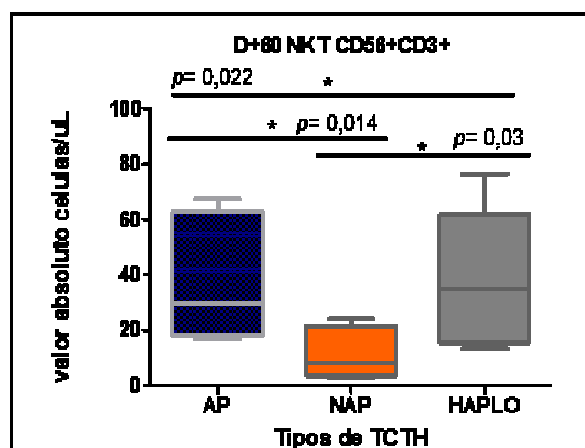


Figura 5.10: Comparação dos valores absolutos de células NKT no D+60 nas três modalidades de transplante. O transplante NAP teve uma diminuição estatisticamente significativa em relação às outras modalidades de transplante ($p= 0,022$), O transplante NAP teve uma diminuição estatisticamente significativa em relação transplante AP ($p= 0,014$) e O transplante NAP teve uma diminuição estatisticamente significativa em relação transplante haploide ($p= 0,03$). A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. (* $p<0,05$; Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis)

5.10 Reconstituição de Linfócitos T

Em relação aos Linfócitos T totais ($CD3^+$), os valores médios encontrados nos doadores saudáveis foram 28% e 2097 células/uL. Os valores absolutos encontrados nos pacientes no pré-transplante foram baixos e bastante semelhantes (em torno de 500 a 1600 células/uL) nas três modalidades, os percentuais variaram, com os transplantes haplo exibindo média ~25% comparado com as outras duas modalidades (~15%). No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa.

Foi verificada uma diminuição no D+30 dos linfócitos T totais em todos os pacientes submetidos a TCTH tanto no grupo HLA-idêntico (AP e NAP) como no grupo haploide, observando-se uma tendência à diminuição no D+30 nos pacientes haploide em relação ao grupo AP e NAP ($p= 0,049$ e $0,035$, valores absolutos e percentuais; teste de Kruskal-Wallis) (Figuras 5.11 e 5.12). Além disso, houve um aumento estatisticamente significativo na reconstituição dos linfócitos T $CD3^+$ no D+120 nos pacientes haploide em relação aos grupos de pacientes AP e NAP ($p<0,05$) (Figura 5.12).

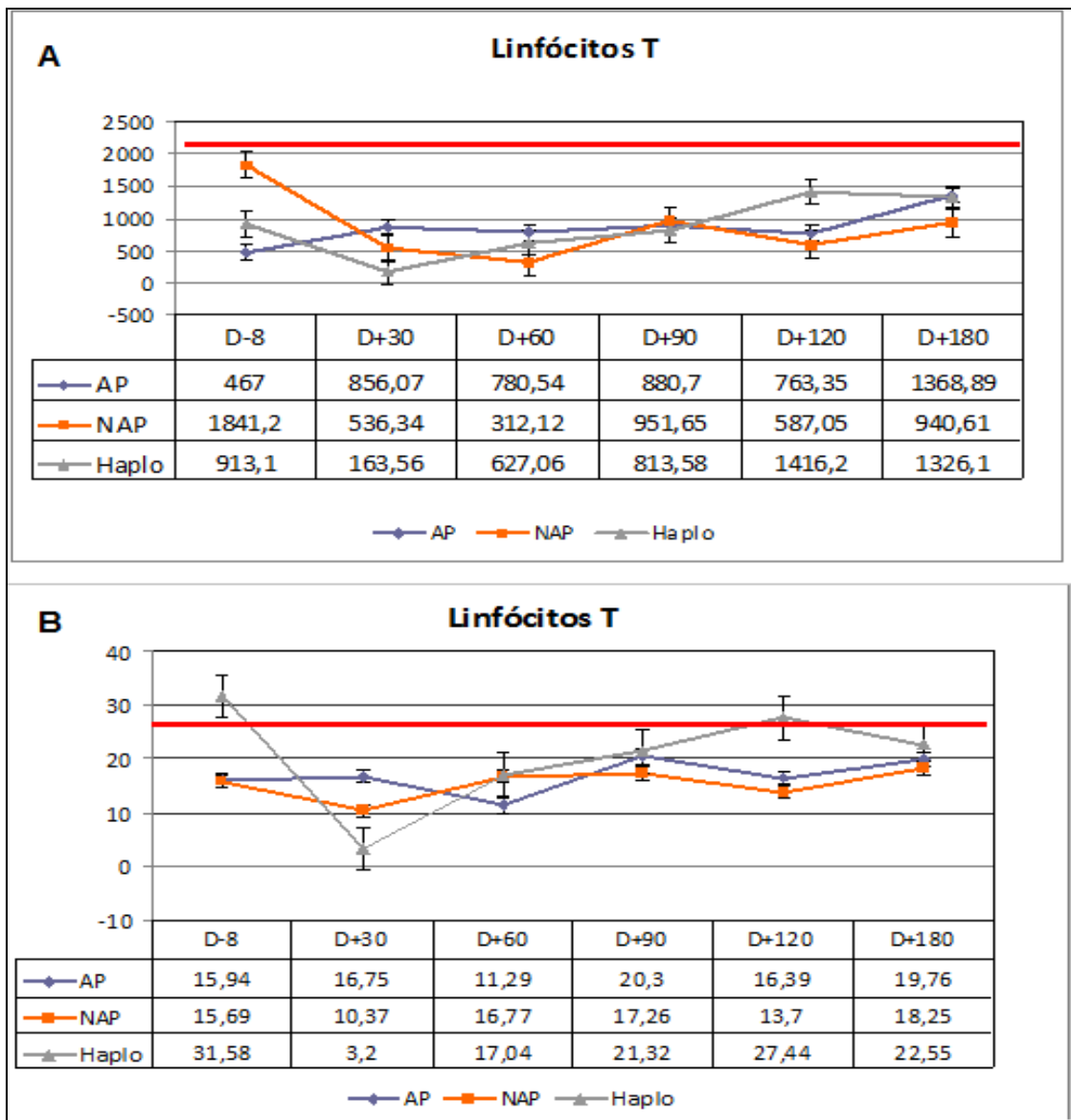


Figura 5.11: Reconstituição de linfócitos T pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos t de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de linfócitos T de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo controle.

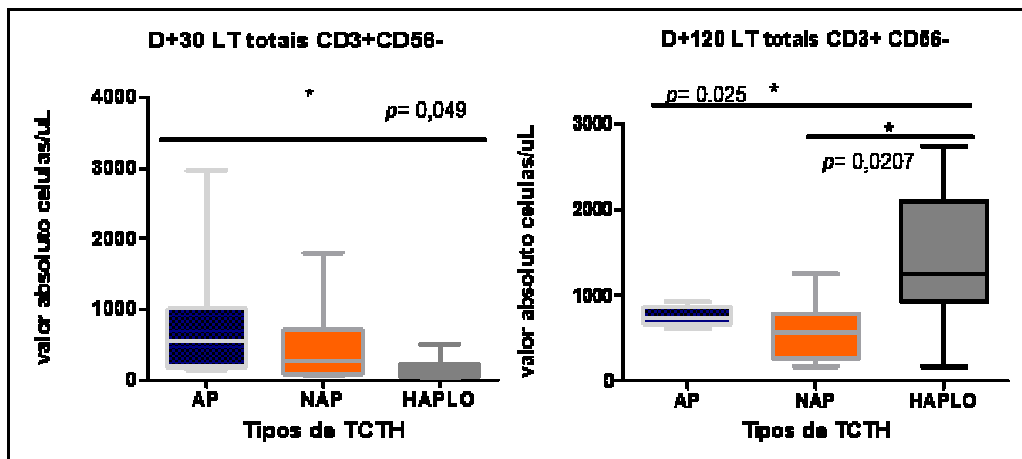


Figura 5.12: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T totais CD3+ no D+90 nas três modalidades de transplante aparentado (AP), não aparentado (NAP) e haploidêntico (HAPLO). No transplante haploidêntico foi verificada uma diminuição significativa de linfócitos T totais no D+30, enquanto que no D+120 houve um aumento numérico e percentual em relação às outras modalidades. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. (* $p < 0,05$; Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis)

Em relação aos Linfócitos T CD8⁺, os valores percentuais e absolutos médios encontrados nos doadores saudáveis foram 10% e 716,7 células/uL, respectivamente. Houve uma queda acentuada no D+30 no grupo de pacientes haploidêntico em relação aos valores pré-transplante e aos outros dois grupos de pacientes AP e NAP, mas sem significância estatística. Além disso, e acompanhando a tendência dos linfócitos T totais, houve um aumento constante numérico e percentual dos linfócitos CD8⁺ nos pacientes submetidos a TCTH haploidênticos a partir do D+90 e até o último ponto de acompanhamento nos 180 dias (Figura 5.13).

O número de linfócitos T CD8⁺ foi associado marginalmente com o desenvolvimento da DECH ($p = 0,052$), e tanto os valores percentuais, como absolutos foram associados com a DECHa severa (graus III/IV) ($p = 0,028$ e $p = 0,021$; teste de Mann-Whitney).

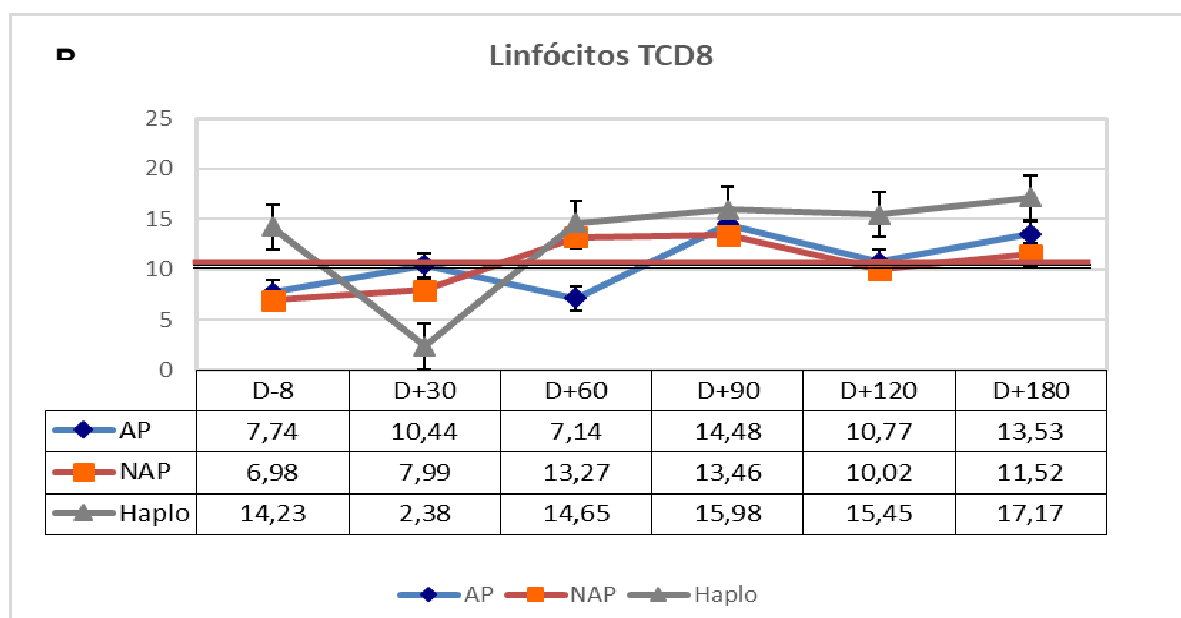
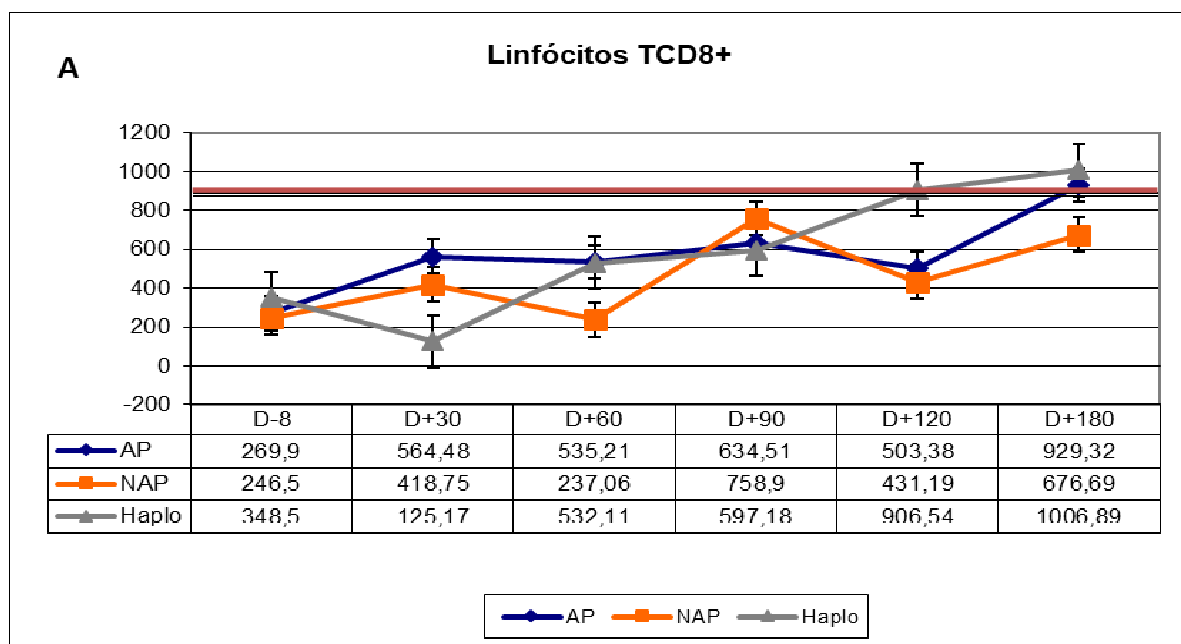


Figura 5.13: Reconstituição dos linfócitos T CD8+ pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos T CD8+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de linfócitos T CD8+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo.

5.11 Reconstituição das populações T CD8+ de linhagem $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$

Durante a sua ontogenia, as células T diferenciam-se em duas linhagens, $\alpha\beta$, que representa a maioria das células T e expressam o TCR heterodimérico $\alpha\beta$ e o $\gamma\delta$, uma linhagem minoritária expressando o TCR heterodimérico $\gamma\delta$. Estas duas linhagens têm diferenças importantes tanto na forma como reconhecem o antígeno (no contexto do MHC na $\alpha\beta$, e independente do MHC na $\gamma\delta$), como na sua função imune em relação ao tipo de antígeno e tempo de ativação na reposta imune (ABBAS *et al*, 2015).

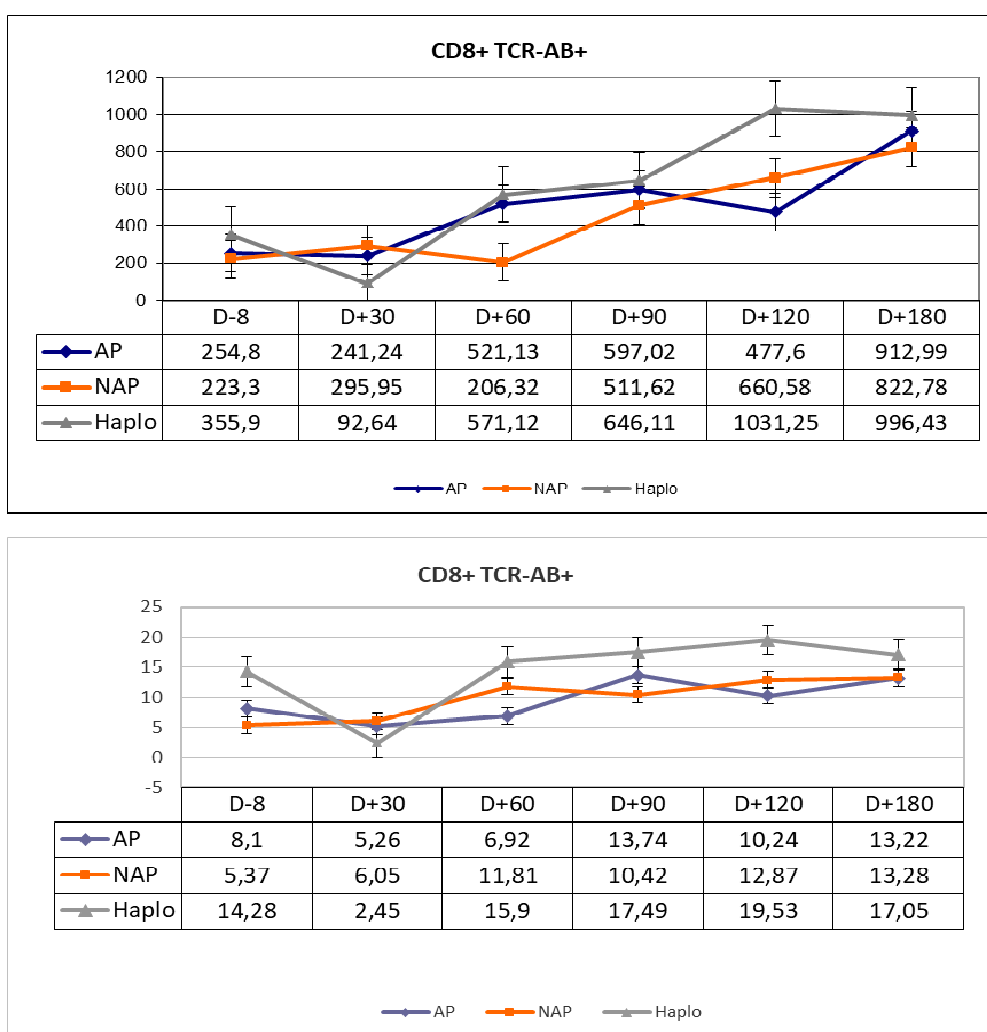


Figura 5.14: Reconstituição de Linfócitos CD8+ TCR $\alpha\beta$ + pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos T CD8+ TCR $\alpha\beta$ + de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de linfócitos T CD8+ TCR $\alpha\beta$ + de cada grupo

Na Figura 5.14 é mostrada a cinética de reconstituição da linhagem $\alpha\beta$ CD8+ que, como esperado por ser a linhagem majoritária, reflete o observado na subpopulação de células T CD8+ (Figura 5.13) tanto em cinética quanto em valores

absolutos e percentuais, e permite afirmar que a recuperação dos níveis de células CD8+ no transplante haplo a partir do D+90 se deve à linhagem $\alpha\beta$.

Os linfócitos T CD8+ $\gamma\delta$, como esperado, foram encontrados em quantidades menores em relação aos valores do $\alpha\beta$, e variaram entre 38 e 100 células/uL e 0,5 a 1,9% ao longo do acompanhamento pós-transplante. No transplante haplo, os valores absolutos e percentuais no D+30 foram maiores que nas outras modalidades de transplante (Figura 5.15), em notável contraste com o padrão observado para as células T CD8+ $\alpha\beta$. No transplante NAP, o pico em valores absolutos e percentuais observados no D+90 também foi contrastante com o observado na sub-população CD8+ $\alpha\beta$. Os valores percentuais tenderam a diminuir para o D+180.

Quantidades altas, e porcentagens maiores de linfócitos T CD8+ $\gamma\delta$ no D+30 estiveram associadas ao desenvolvimento da DECHa ($p= 0,018$ e $0,033$, respectivamente, Teste de Mann-Whitney). O mesmo foi verificado quando os pacientes foram categorizados pelos valores médios da quantidade absoluta dessas células; dos 8 pacientes com DECHa, 5 (62,5%) apresentavam valores superiores à média (32 células/uL), comparados com 2/15 pacientes sem DECHa (13%) ($p= 0,017$; teste Exato de Fisher). Uma tendência no mesmo sentido foi observada quando considerados os pacientes com DECHa severa (graus III/IV) ($p= 0,076$), provavelmente pelo baixo número de casos considerados.

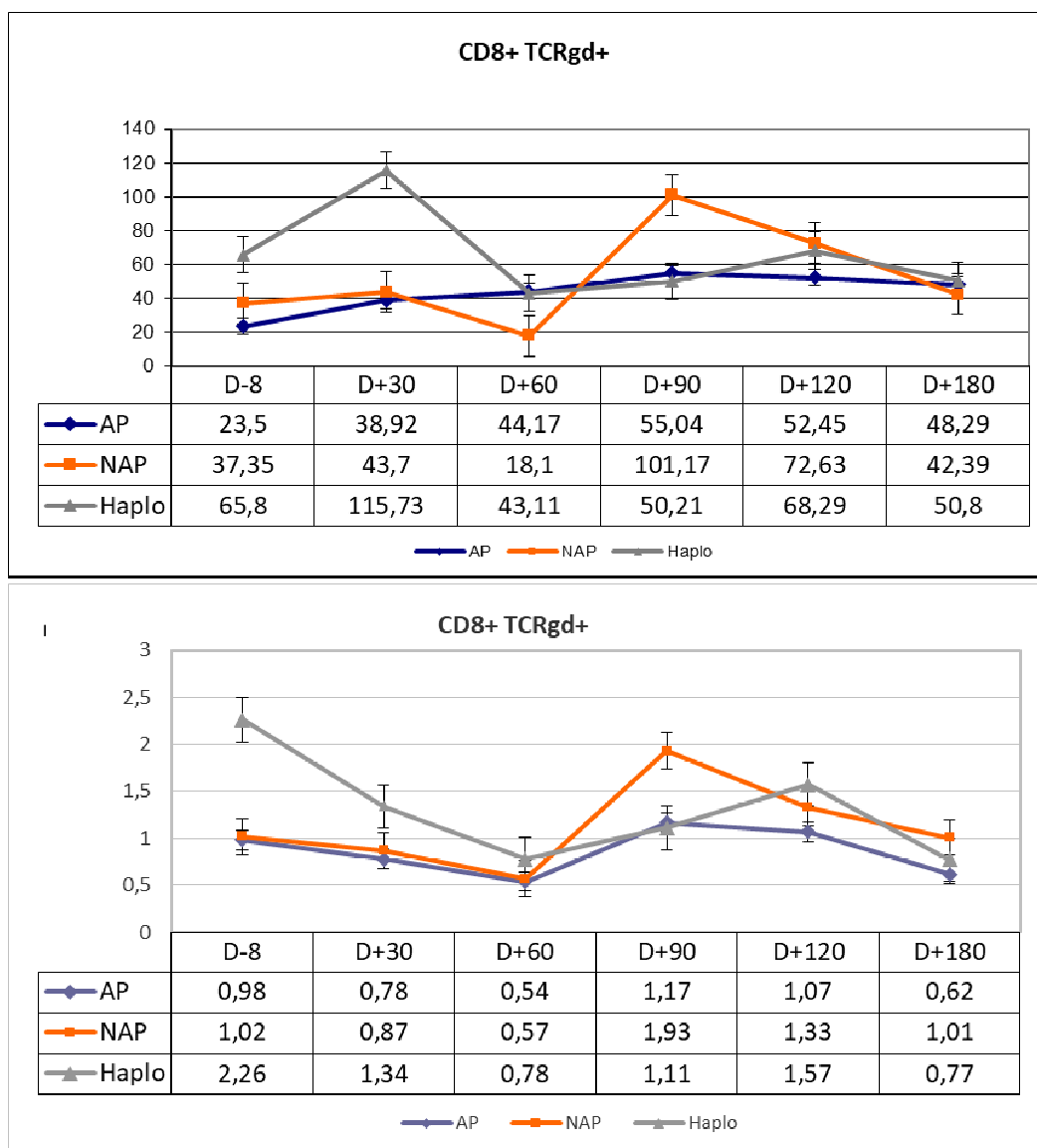


Figura 5.15: Reconstituição de Linfócitos T citotóxicos CD8+TCR $\gamma\delta$ + pós- TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos T CD8+ TCR $\gamma\delta$ + de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de linfócitos T CD8+ TCR $\gamma\delta$ + de cada grupo.

Em relação aos Linfócitos T CD4+, em valores absolutos houve uma diminuição no D+30 nos grupos NAP e haplo, sendo este último grupo o que sofreu uma queda maior e significativa ($p= 0,002$; teste de Kruskal-Wallis). Já em termos percentuais, os três grupos exibiram uma diminuição relativa das células T CD4+ ($p= 0,035$) no D+30. Quando os pacientes foram categorizados de acordo com a mediana (48 células/ μ l) de recuperação de linfócitos T CD4+ no D+30, foi observado que todos os pacientes submetidos a transplante AP exibiram uma recuperação maior que a mediana, quando comparados aos pacientes submetidos aos transplantes NAP (45,5%) e haploidêntico (12,5%) ($p= 0,003$; teste χ^2). A

comparação dos casos em relação à média (114,5 células/ul) também mostrou valores significativos ($p= 0,023$; teste X^2). A partir do D+90, houve uma recuperação no grupo haploidêntico em relação aos grupos de pacientes AP e NAP (Figura 5.16).

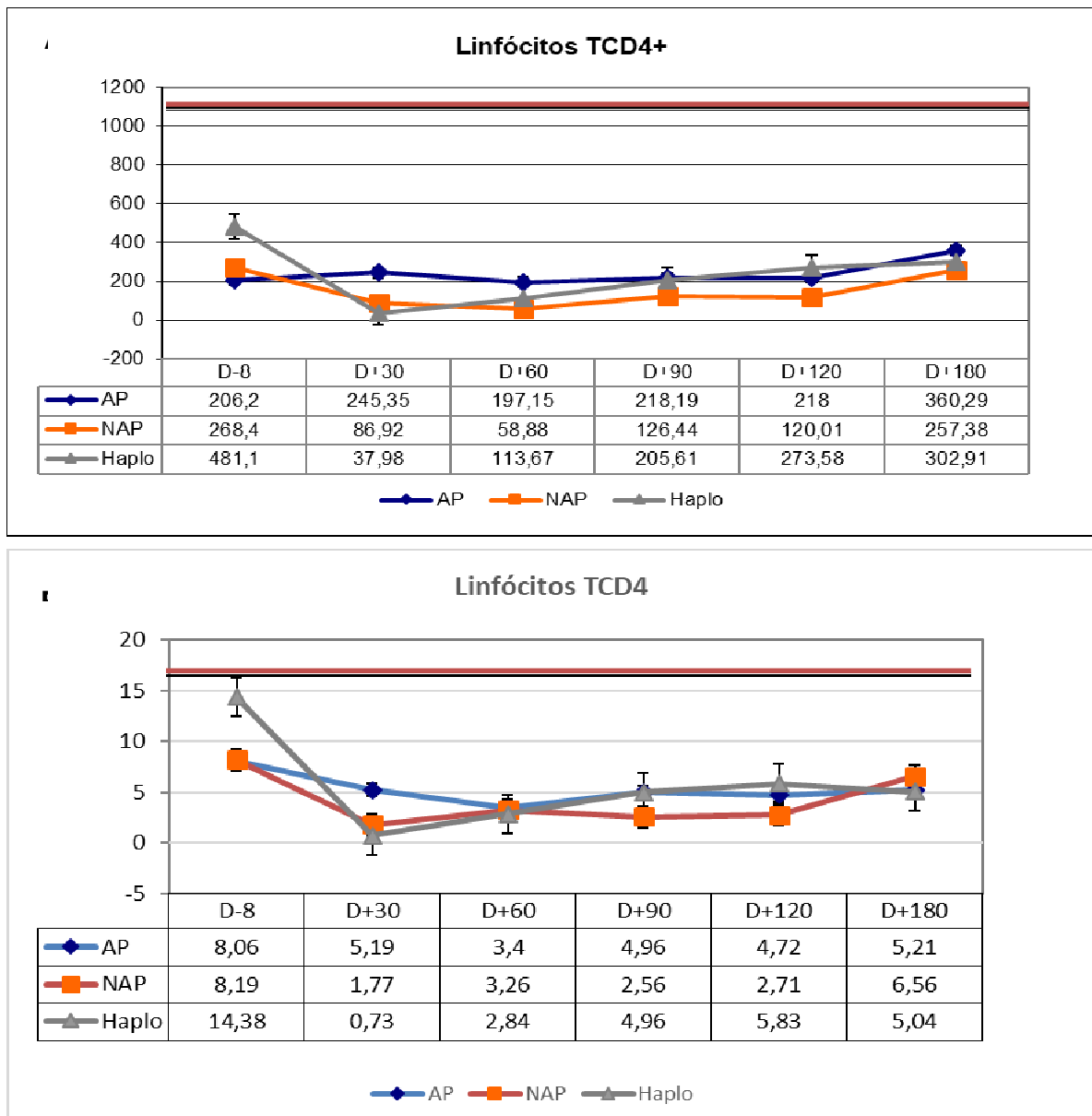


Figura 5.16: Reconstituição de Linfócitos T helper CD4+ pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos T CD4+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de linfócitos T CD4+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo.

A figura 5.17 mostra os pontos temporais em que houve diferenças significativas entre os três grupos terapêuticos, sendo possível observar a recuperação significativa dos níveis de linfócitos T CD4+ no grupo haploidêntico.

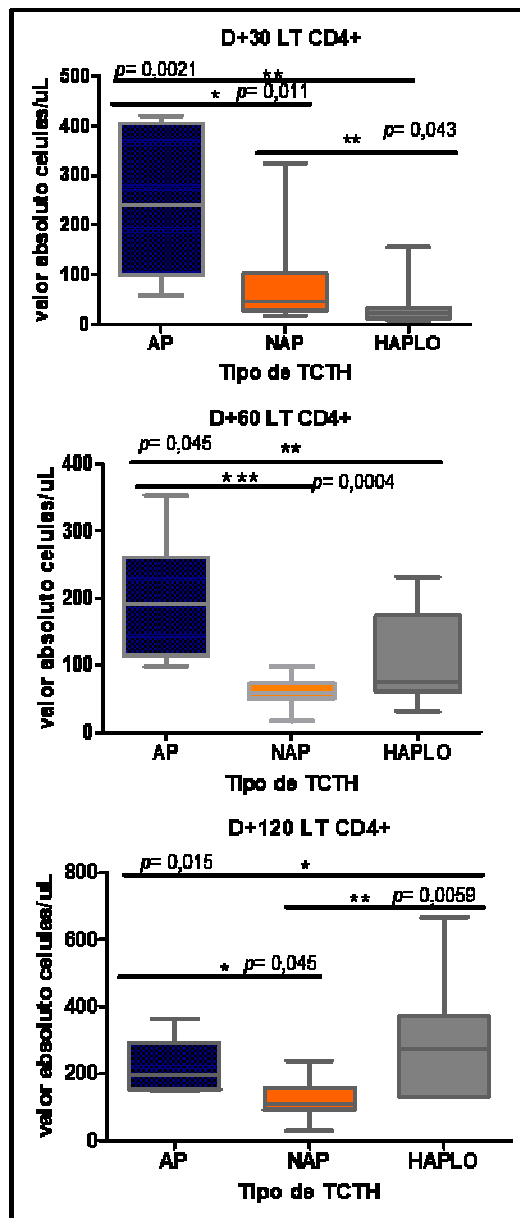


Figura 5.17: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T helper CD3+CD4+. D+30, D+60 e D+120 nas três modalidades de transplante (aparentado, AP; não aparentado, NAP e haploidêntico, HAPLO) estatisticamente significativas $p=0,002$, $p=0,0045$ e $p=0,015$, respectivamente. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; * $p<0,001$; **** $p<0,0001$; Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis)**

5.12 Reconstituição das populações linfocitárias CD4+ de linhagem $\alpha\beta$

Na Figura 5.18 é mostrada a cinética de reconstituição da linhagem CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ que, como esperado por ser a linhagem majoritária, reflete o observado na sub-população de células T CD4⁺ (Figura 5.16) tanto em cinética quanto em valores absolutos e percentuais, e permite afirmar que a recuperação dos níveis de células CD4⁺ no transplante haploidêntico se dá após o D+30 e se deve à linhagem $\alpha\beta$. Além disso a figura 5.19 mostra os pontos temporais onde houve diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,0029$ e $0,0058$, respectivamente;

teste de Kruskal-Wallis) entre os três tipos de transplante, sendo possível observar uma queda marcada no D+30 do transplante haploidêmico em relação ao transplante AP e uma recuperação significativa dos níveis de linfócitos T CD4+ $\alpha\beta$ no grupo haploidêmico no D+60 e uma diminuição da recuperação imune no transplante NAP em relação aos outros dois grupos de transplante.

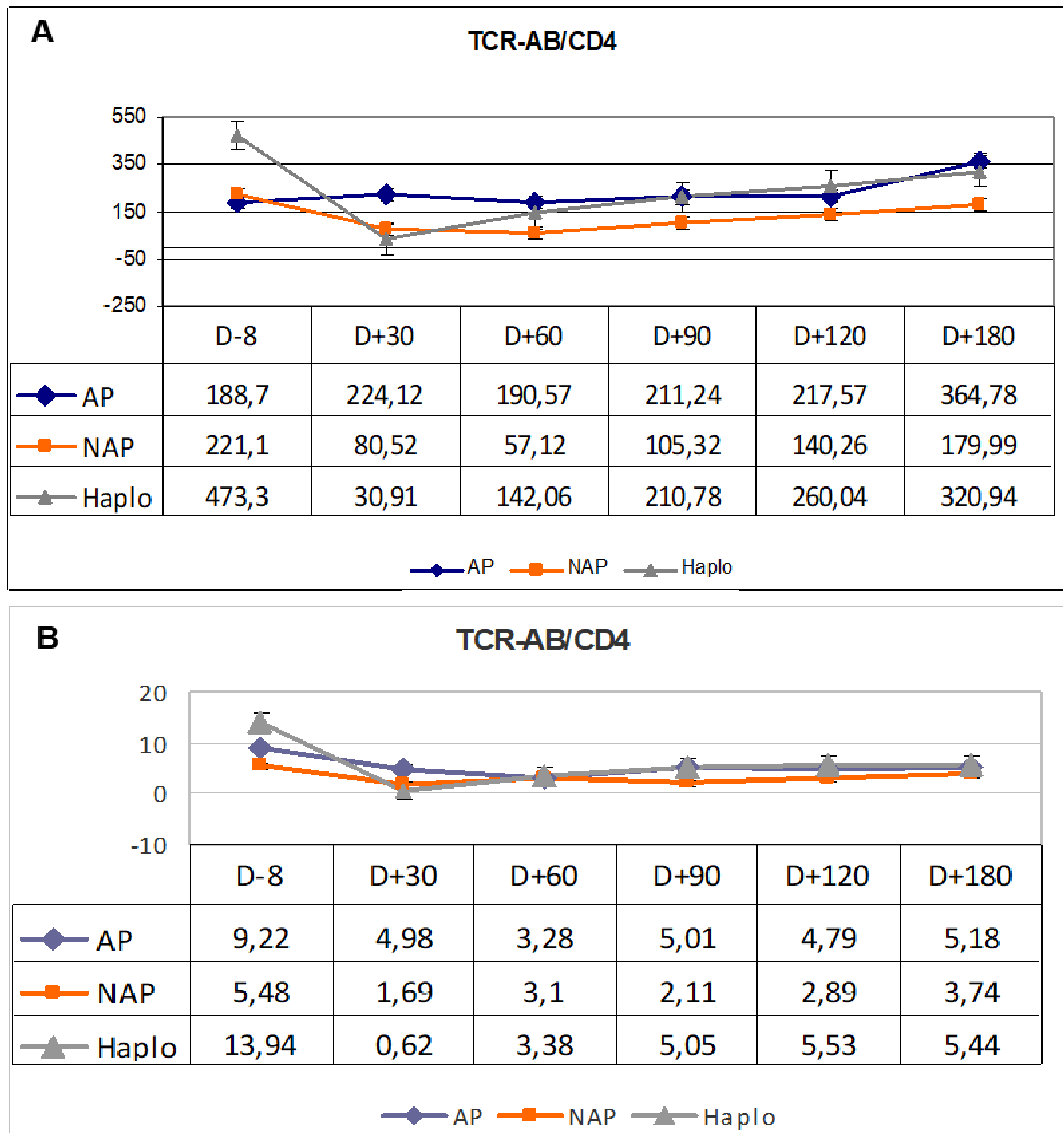


Figura 5.18: Reconstituição de linfócitos T CD4+/TCR $\alpha\beta$ + pós-TCTH alogênico. Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos T CD4+ TCR $\alpha\beta$ + de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) de linfócitos T CD4+ TCR $\alpha\beta$ + de cada grupo.

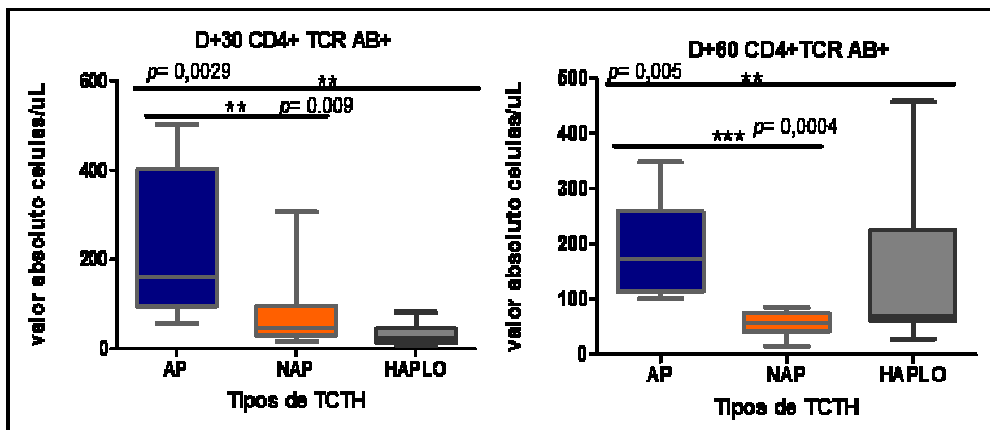


Figura 5.19: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T CD4+/TCRab+. Comparação dos valores absolutos dos Linfócitos T CD4+ TCR $\alpha\beta$ + nos D+30, D+90 nas três modalidades de transplante (aparentado, AP; não aparentado, NAP e haploidêntico, Haplo). estatisticamente significativas $p= 0,0029$ e $0,0058$, respectivamente. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. (** $p<0,01$; *** $p<0,001$; Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis).

5.13 Relação linfócitos T helper CD4+/ linfócitos T CD8+

Nos indivíduos saudáveis, a relação T CD4+/CD8+ é de 2/1, ou seja, normalmente encontramos duas vezes mais células T *helper* CD4+ (Th) do que células T citotóxico CD8+ (CTL) (TOUBERT, 2012). No caso dos pacientes submetidos ao transplante, é possível observar que no D-8, existe uma variação entre os grupos, em que a razão de células T CD4+/ CD8+ é >1 nos transplantes haplo e NAP, comparado com o AP. Esta proporção se inverte no pós-transplantes em todas as modalidades e se mantém invertida até o último ponto do acompanhamento (D+180) (Figura 5.20).

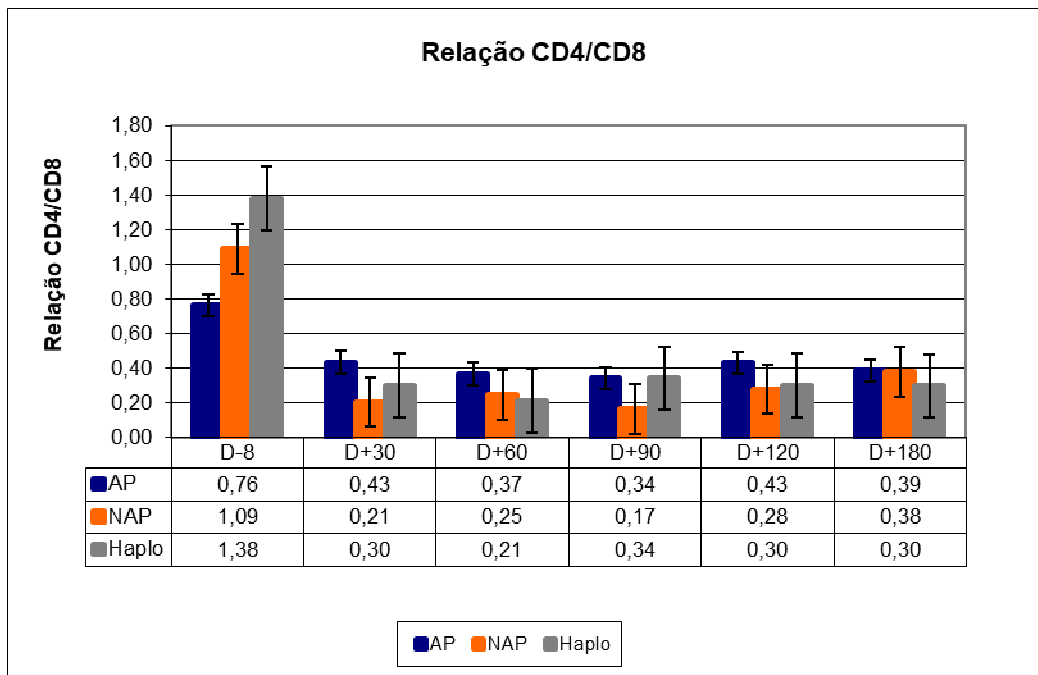


Figura 5.20: CD4/CD8 no pós-TCTH alogênico. Os valores na tabela representam a proporção entre valores absolutos de linfócitos T CD4⁺ / linfócitos T CD8⁺ em cada grupo terapêutico, nos diferentes pontos do acompanhamento.

5.14 Reconstituição de linfócitos T *naive*/efetores e de memória

Para avaliar o efeito do TCTH nas subpopulações de linfócitos T efetores e de memória foram utilizados marcadores fenotípicos que permitem distinguir os vários estágios de diferenciação funcional dos linfócitos T helper CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. Estes estágios incluem linfócitos T *naive* ou efetores CD45RA⁺/CD45RO⁻ (CD4⁺ ou CD8⁺), e linfócitos T de memória CD45RO⁺/CD45RA⁻ (CD4⁺ ou CD8⁺).

Em relação aos Linfócitos T helper de memória CD4⁺/CD45RO⁺ a média das porcentagens observadas nos controles saudáveis foi 1%, e a média dos valores absolutos foi de 112,88 células/uL. Como mostrado na Figura 5.21, nesta subpopulação houve uma queda no D+30 do grupo NAP e haploidêntico em comparação ao pré-transplante; comportamento que foi diferente ao observado no grupo AP, em que, a partir de um valor menor que a média (mas dentro da faixa de normalidade) no pré-transplante, os valores absolutos e percentuais aumentaram no D+30 ($p= 0,001$ e $0,013$, respectivamente; teste de Kruskal-Wallis) e tenderam a se estabilizarem em pontos subsequentes.

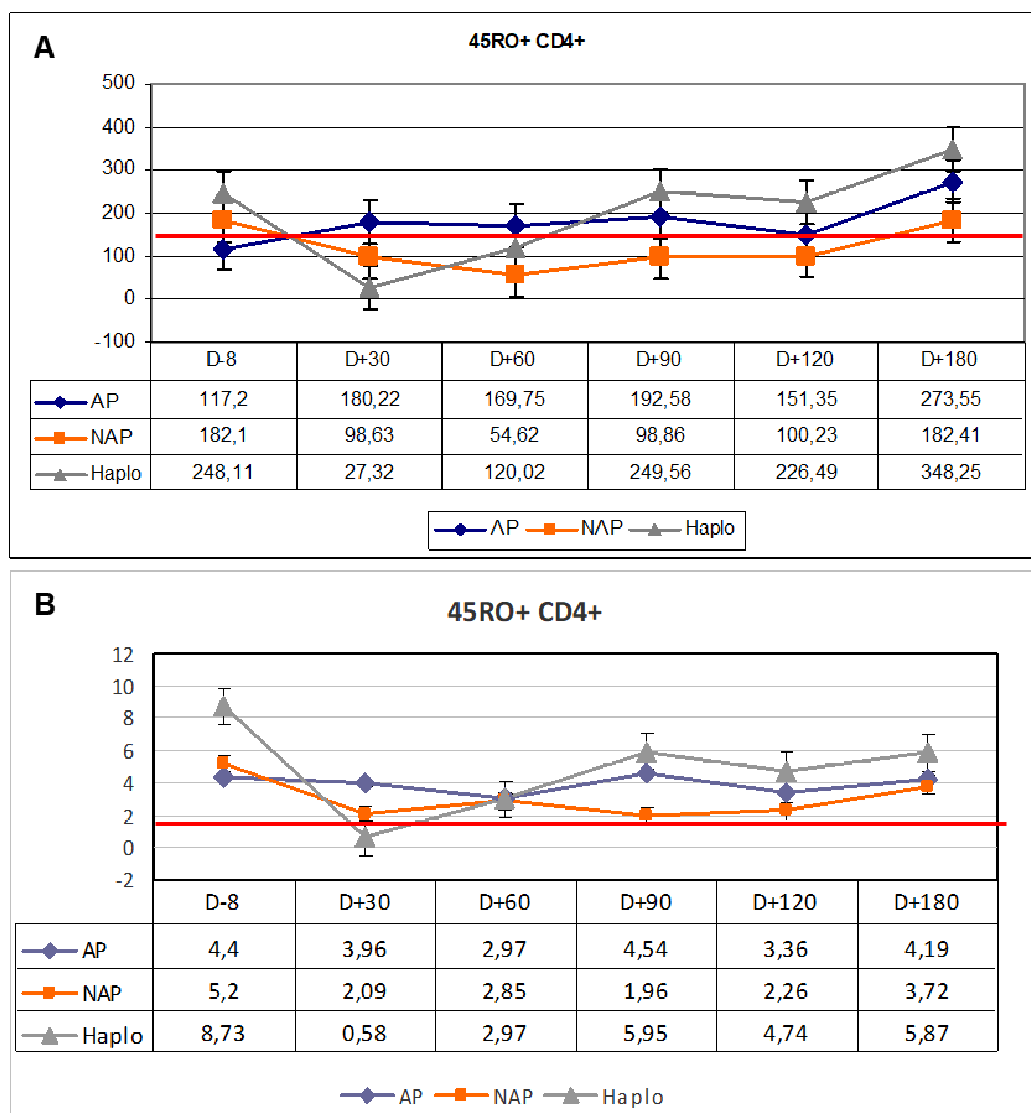


Figura 5.21: Reconstituição de linfócitos T de memória CD4+CD45RO+ pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de Linfócitos T helper efetores de memória CD45RO+ CD4+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens de Linfócitos T helper efetores de memória CD45RO+ CD4+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo de doadores saudável.

Já nos pacientes submetidos ao transplante haploide, após uma diminuição brusca no D+30, as células Th de memória exibiram uma tendência crescente acompanhando a partir do D+90 a cinética do transplante AP com valores inclusive maiores. O transplante NAP mostra uma cinética mais lenta de reconstituição das células Th de memória que só a partir do D+180 alcança a média dos valores absolutos dos indivíduos saudáveis.

Na Figura 5.22 podemos observar o comportamento relativamente estável da sub-população CD4+CD45RO+ no transplante AP no D+30 e D+60, comparado com o NAP e haploide, que tiveram cinéticas opostas e significativamente diferentes.

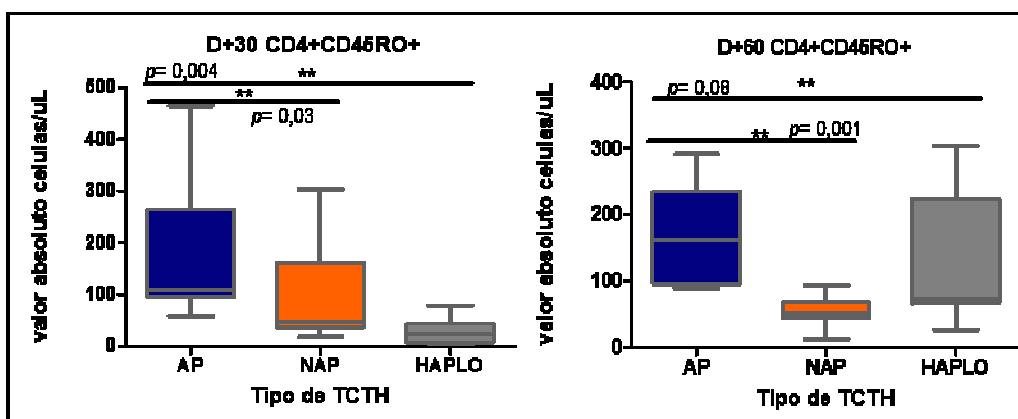


Figura 5.22: Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T helper de memória CD45RO+CD4+. Comparação dos valores absolutos dos Linfócitos T herper de memória CD45RO+CD4+ no D+30 e D+60 nas três modalidades de transplante. O transplante haploidêntico teve valores significativamente menores no D+90 com um aumento estatisticamente significativo para o D+60. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. (**p<0,01; Testes de Mann-Whitney e Kruskall-Wallis).

Em relação aos linfócitos Th naive/efetores CD45RA+CD4+, em nosso estudo foi possível observar uma lenta reconstituição, estando os números absolutos e percentuais dessa subpopulação significativamente diminuídos em relação ao pré-transplante e ao grupo controle. Durante o tempo de acompanhamento não houve evidência de cinética crescente das células Th efetoras CD45RA+CD4+ (Figura 5.23).

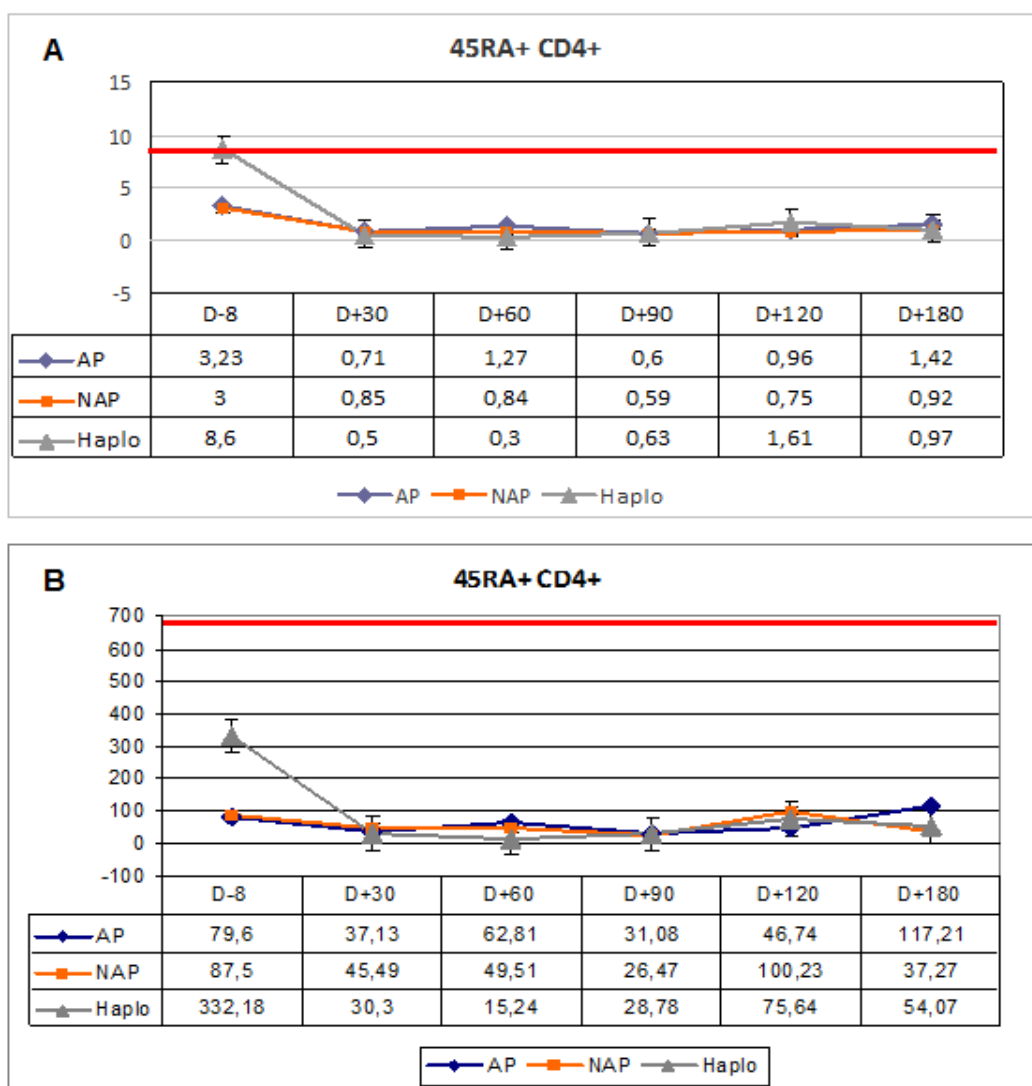


Figura 5.23: Reconstituição de linfócitos T helper *naive*/efetores CD4+CD45RA+ pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de Linfócitos T helper efetores CD45RA+ CD4+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens Linfócitos T helper efetores CD45RA+ CD4+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo controle.

Em relação aos Linfócitos T de memória CD8+CD45RO+, a média das porcentagens observadas nos controles saudáveis foi 2%, e a média dos valores absolutos foi de 152 células/uL. Como mostrado na Figura 5.25, nesta subpopulação houve uma queda leve no D+30 nos grupos AP e haploidêntico em comparação ao pré-transplante; comportamento que foi diferente ao observado no grupo NAP que teve um aumento superando a média de normalidade desde o D+30. Além disso, foi observado que os grupos NAP e haploidêntico apresentam uma oscilação durante o tempo de acompanhamento, enquanto que a recuperação nos pacientes submetidos a transplante AP em geral teve uma cinética crescente. Em termos de porcentagem, os transplantes AP e NAP tiveram cinéticas semelhantes,

com velocidade de reconstituição maior do grupo NAP, sendo que no transplante haplo verificou-se a mesma tendência a distribuição bimodal (D+60 e D+120) observada na contagem absoluta. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as três modalidades de transplante (Figura 5.24).

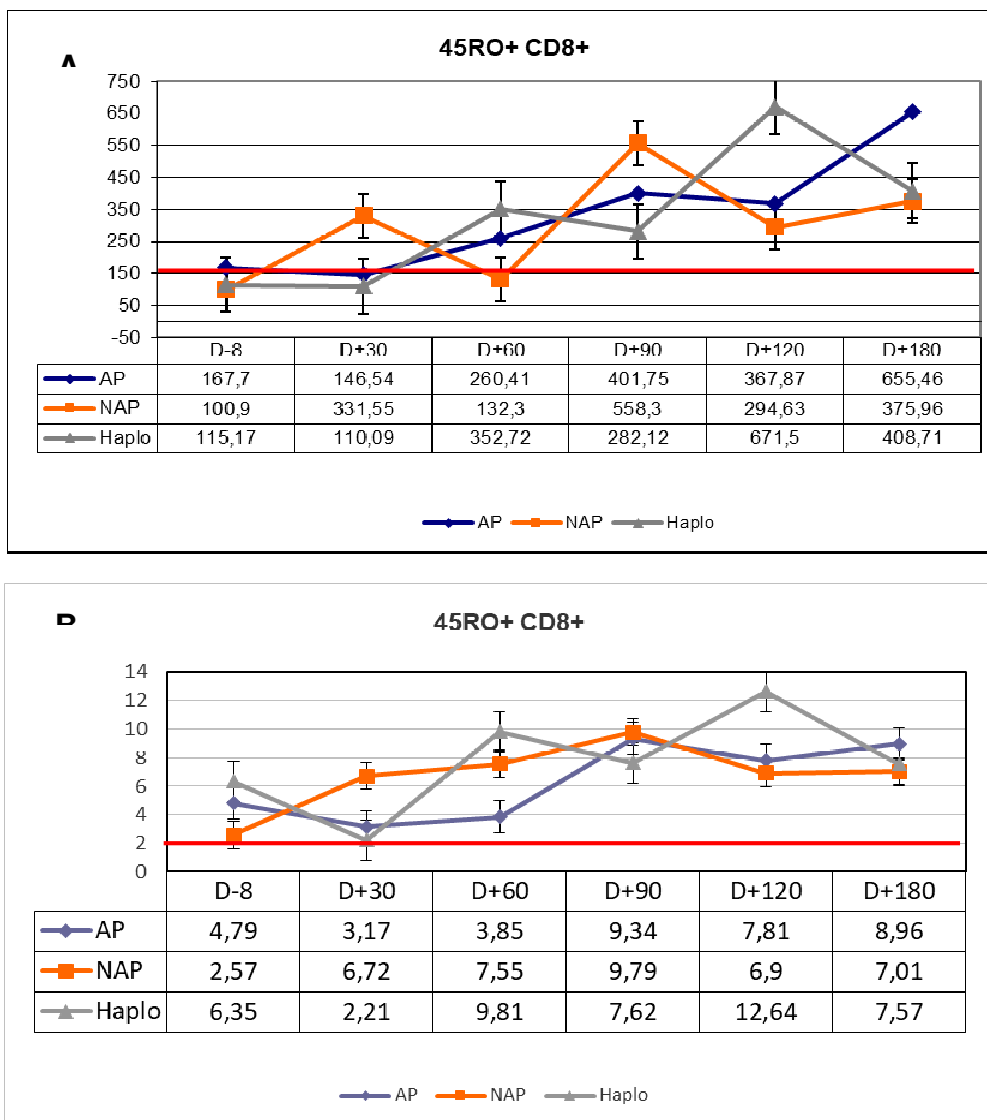


Figura 5.24: Reconstituição de linfócitos T CD8+CD45RA+ pós-TCTH alogênico. Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de Linfócitos T efetores CD45RA+CD8+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) Linfócitos T efetores CD45RA+CD8+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo.

Em relação aos Linfócitos T citotóxicos efetores CD45RA+ CD8+, os valores médios encontrados nos doadores saudáveis foram 504,8 células/uL e 7%. Os valores médios absolutos encontrados nos pacientes no pré-transplante variaram de acordo com o tipo de transplante, entre 66 células/uL no transplante AP; 156 células/uL no NAP e 364 células/uL no haploidêntico, sugerindo fatores no

condicionamento associados a essa variabilidade. A diferença se manteve em termos percentuais, sendo que a média de representatividade percentual das células citotóxicas efectoras foi ~14% nos casos haploidêntico ($p= 0,035$). A partir da composição diferencial nas modalidades de transplante, houve uma queda brusca no D+30 no haploidêntico, seguida de uma cinética de recuperação rápida a partir do D+60, em que os valores médios dos controles saudáveis são alcançados e superados. Os outros grupos também exibiram cinética crescente de recuperação, porém mais lenta, nos pontos do acompanhamento (Figura 5.25).

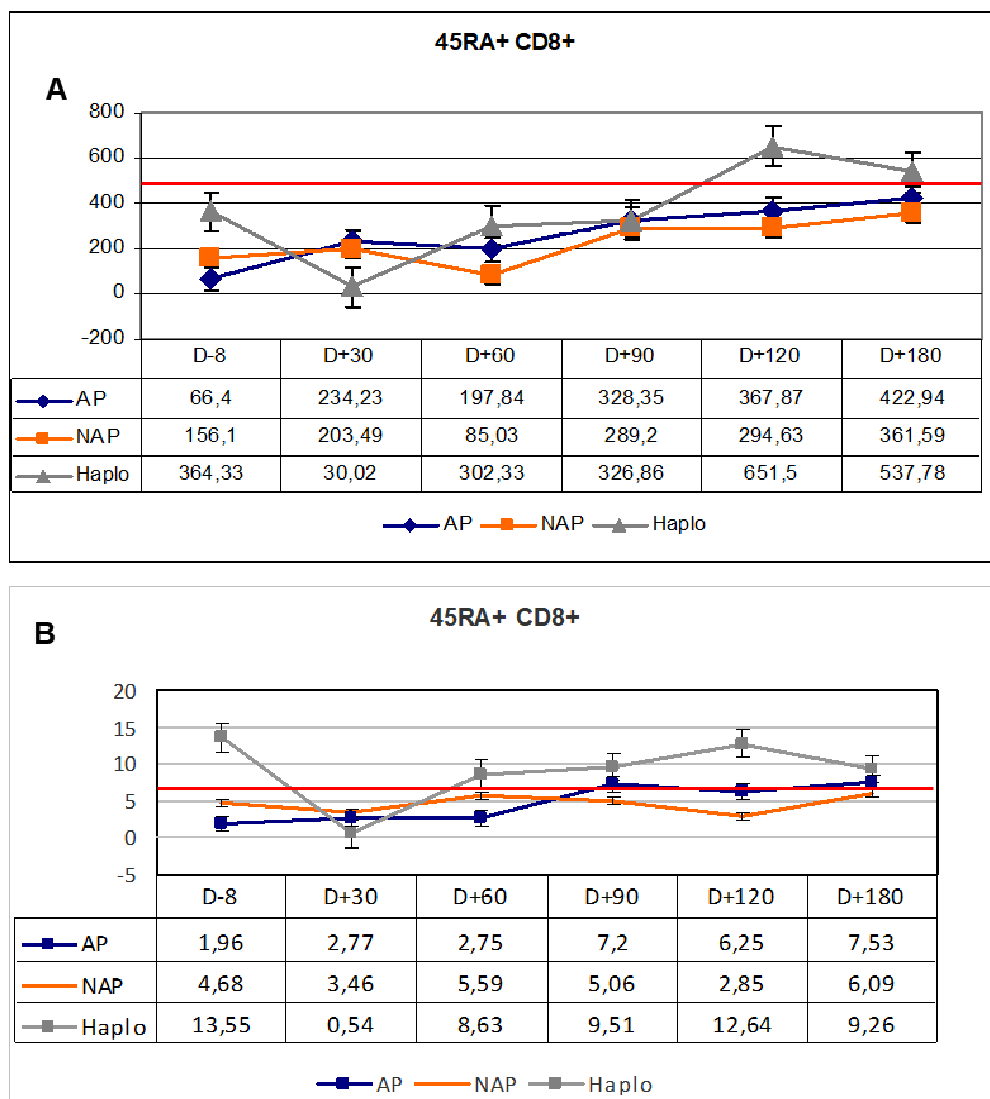


Figura 5.25: Reconstituição de linfócitos T CD8+CD45RA+ pós-TCTH. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de Linfócitos T efectoras CD45RA+CD8+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) Linfócitos T efectoras CD45RA+CD8+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo.

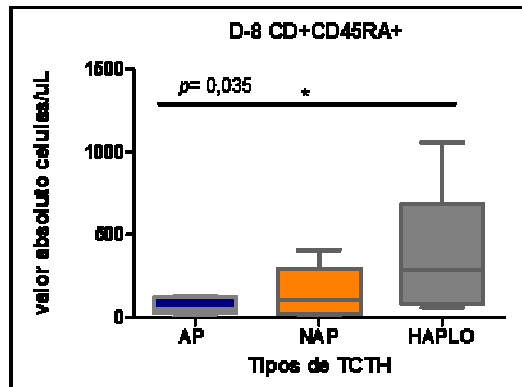


Figura 5.26: Comparação dos valores absolutos e percentuais dos linfócitos T CD8+CD45RA+ no pré-transplante nas três modalidades de transplante aparentado AP, não aparentado NAP e haploidêntico. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. (* $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis).

5.15 Relação entre linfócitos T CD8+ de memória e efetores

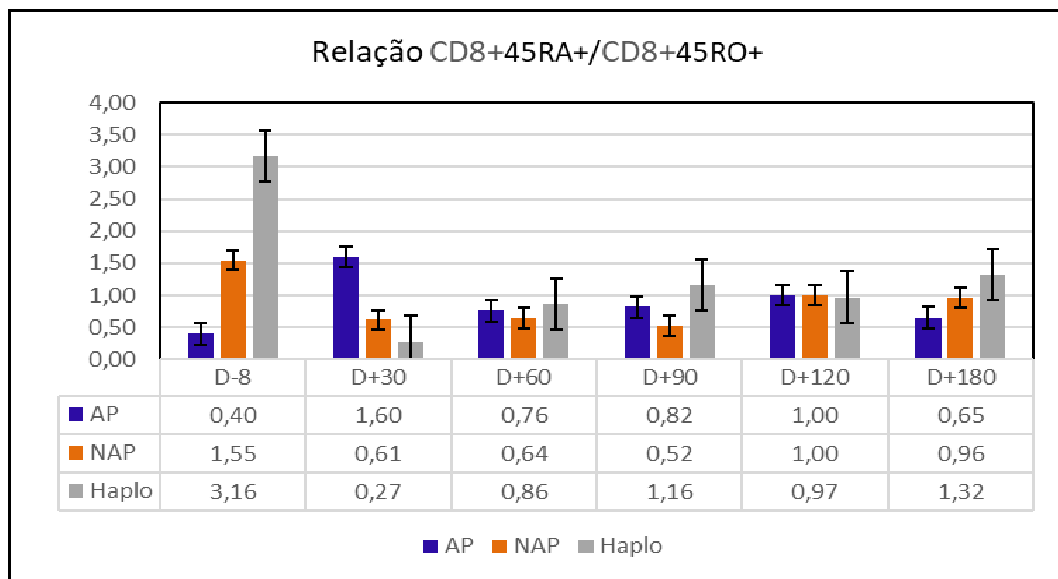


Figura 5.27: Relação CD45RA+CD8+/CD45RO+CD8+ no pós-TCTH alogênico. Os valores na tabela representam a proporção entre valores absolutos de linfócitos T CD45RA+CD8+/CD45RO+CD8+ em cada grupo de TCTH, nos diferentes pontos do acompanhamento.

Com o intuito de avaliar a dinâmica de reconstituição das populações de linfócitos T CD8+ de memória e naive, observamos uma diferença no ponto de partida, em que os pacientes pré-transplante AP tinham uma predominância de linfócitos *naive* CD8+CD45RO+ em comparação com os pacientes pré-transplante haploidêntico que exibiram uma predominância de linfócitos de memória CD8+CD45RO+. Esta relação foi completamente invertida no D+30, porém sem significação estatística ($p = 0,086$; teste de Kruskal-Wallis) (Figura 5.27). Quando os

pacientes foram categorizados de acordo com a média da relação CD8+RA/RO, foi observado que todos os submetidos a transplante AP exibiram uma relação RA/RO maior que a média, quando comparados aos pacientes submetidos aos transplantes NAP (66%) e haploidêntico (14%) ($p= 0,007$; teste X^2).

Nos seguintes pontos D+30 e D+60 de acompanhamento o transplante haploidêntico mostrou uma tendência a recuperação mais rápida dos linfócitos de memória. Durante os primeiros 90 dias pós -transplante, o grupo NAP mostrou predominância de linfócitos efetores.

5.16 Reconstituição de linfócitos T com expressão de co-estimuladores

Na reconstituição dos linfócitos T durante o tempo de acompanhamento houve uma maior recuperação dos linfócitos T CD8+CD28+ que os linfócitos TCD4+CD28+. O número absoluto de linfócitos T CD8+CD28+ aumentou significativamente no grupo de pacientes submetidos a transplante AP no D+90 alcançando valores de mais de 400 células/ul em relação aos submetidos ao transplante NAP e haploidêntico. Além disso, em relação aos níveis pré-transplante, houve uma cinética decrescente até o D+60 no transplante NAP em relação ao transplante haploidêntico, que apresentou a queda no D+30 com posterior recuperação (Figura 5.28).

Em relação aos linfócitos T CD4+CD28+, os pacientes submetidos a transplante AP, apesar de terem menor quantidade desses linfócitos no pré-transplante, recuperaram e mantiveram os valores mais rapidamente. Já no transplante haploidêntico houve uma queda significativa no D+30, seguida de cinética crescente lenta (Figura 5.28).

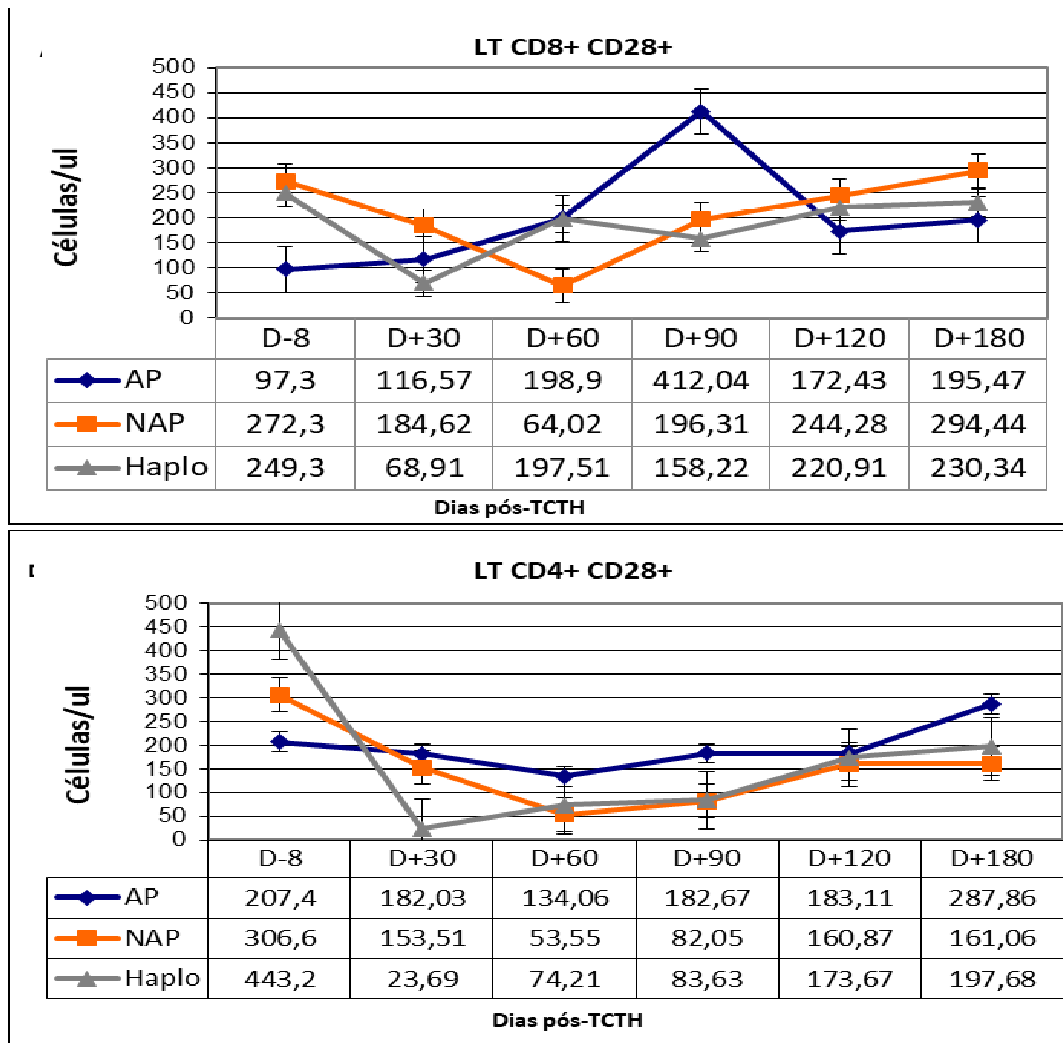


Figura 5.28: Reconstituição de linfócitos T CD8+CD28+ e linfócitos T CD4+CD28+ pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/μl) de Linfócitos T CD8+CD28+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A. B) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/μl) de Linfócitos T CD4+CD28+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão.

5.17 Reconstituição de linfócitos B

A quantidade normal de células B encontradas no sangue periférico de indivíduos saudáveis varia de 10 a 15% dos linfócitos totais (TOUBERT A, 2012). No presente estudo observamos um valor médio de 10%, com valores absolutos entre 215 e 1500 células/uL (média 512). A figura 5.30 mostra os valores encontrados durante o acompanhamento dos pacientes submetidos a TCTH-alogênico.

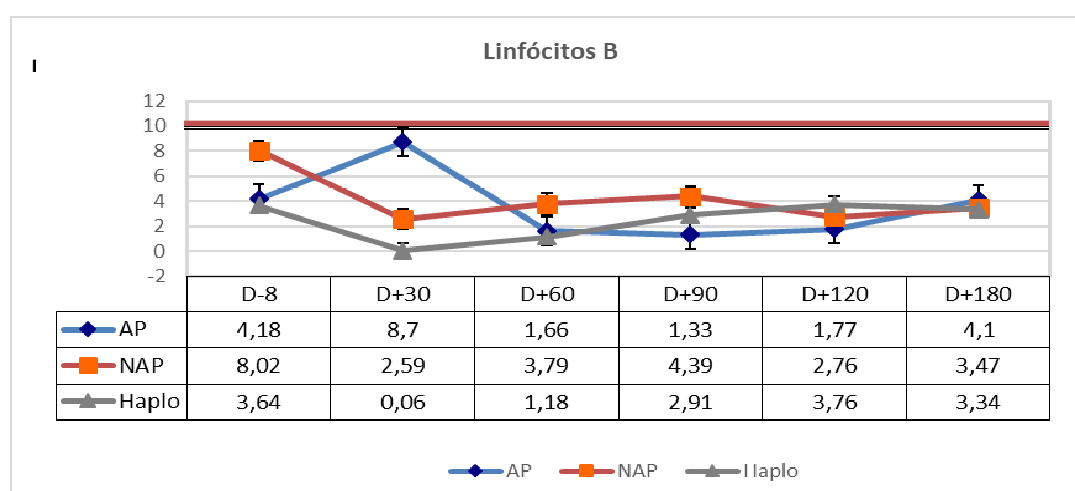
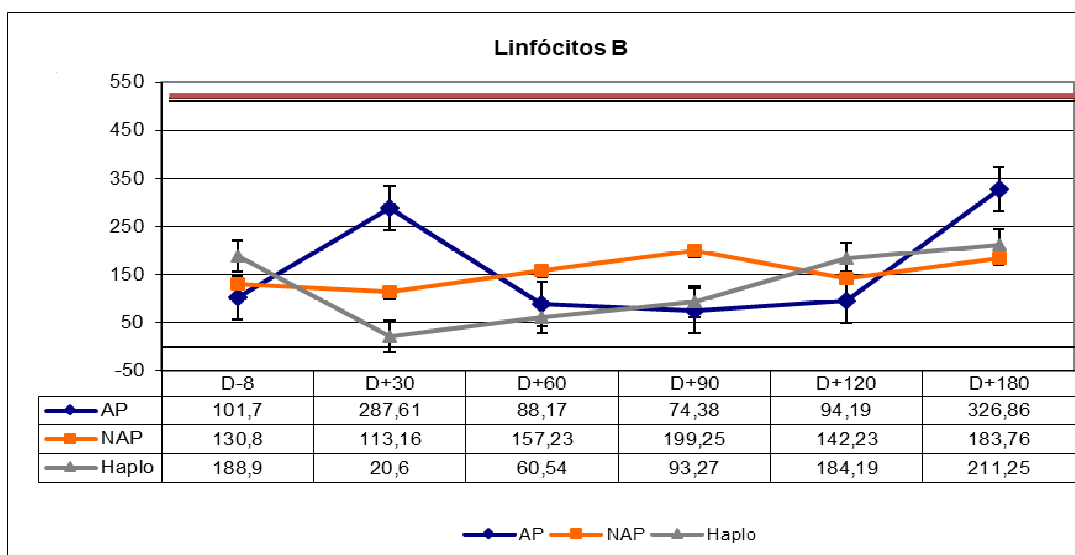


Figura 5.29: Reconstituição de linfócitos B CD19+ pós-TCTH alogênico. A) Valores absolutos: Os valores na tabela representam a média dos valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos B CD19+ de cada grupo. A barra de erro representa o erro padrão. A linha vermelha corresponde à média dos valores absolutos obtidos no grupo controle. B) Porcentagem: Os valores na tabela representam a média das porcentagens (%) linfócitos B CD19+ de cada grupo. A linha vermelha corresponde à média das porcentagens obtidas no grupo.

A recuperação quantitativa das células B circulantes ocorreu seguindo algumas etapas distintas; inicialmente, a contagem das células B CD19+ permaneceu baixo, em valores inferiores ao limite inferior de normalidade em todos os pontos até o D+180, com exceção do D+30 em que o grupo AP teve valores altos. Os grupos de transplante exibiram curvas de recuperação particulares, porém sem diferenças estatísticas significativas em nenhum dos pontos de acompanhamento. Todos os grupos mostram uma tendência em aumento para os D+180.

5.18 Infecções virais

Dentre os 31 pacientes estudados neste trabalho, em 23 (74,2%) foram documentados um ou mais eventos de infecção viral, por um ou mais vírus, durante o tempo de acompanhamento (D-8 até D+180). Desses 23 pacientes, 4/7 foram submetidos ao transplante AP (57,1%), 8/12 ao transplante NAP (66,7%) e 11/12 ao transplante haploidêntico. Não houve diferenças significativas nas frequências de reativação/infecção viral entre as três modalidades de transplante ($p= 0,22$; teste Exato de Fisher).

Os eventos de reativação ou infecção viral observados nos diferentes grupos de transplantes são mostrados na Tabela 5.3. O CMV foi o vírus com maior taxa de reativação nas três modalidades, tendo sido o único vírus detectado no transplante AP. É de se ressaltar a frequência relativamente alta de infecções pelo poliomavírus BK nos transplantes NAP e haplo. O Herpesvírus humano 6 (HHV-6) foi outro que foi detectado apenas nessas duas modalidades de transplante.

Os transplantes NAP e Haplo tiveram similar número de reativações, entretanto, nos pacientes submetidos ao transplante NAP, houve maior número de reativações por paciente, como surge da análise do índice (I) construído na Tabela 5.3. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,106$, teste Exato de Fisher)

Tabela 5.3: Perfil das reativações virais nas diferentes modalidades de transplante

Vírus / Transplante	Aparentado	Não aparentado	Haploidêntico
CMV	5	10	11
EBV	0	2	0
HHV-6	0	2	1
VZV	0	0	1
BK	0	4	4
Adenovírus	0	0	1
Eventos+ /Pts+ (I)	5/4 (1,25)	18/8 (2,25)	18/11 (1,63)

Pts, pacientes. (I) índice de eventos por pacientes.

Em relação aos tempos pós-transplante, a reativação do CMV ocorreu de maneira equilibrada nos D+30, +60 e +90 nos pacientes submetidos ao transplante AP. Já nos transplantes NAP e haploidêntico, o período entre D+30 e D+60 foi aquele com maior frequência de reativação do CMV. No D+60, foi verificada uma

frequência de 83,3% de reativação do CMV no transplante haplo, comparada com 58,3% no NAP e 28,6% no AP ($p= 0,06$; Teste exato de Fisher). Já o HHV-6 foi detectado dentro dos 30 primeiros dias após o transplante (Figura 5.30).

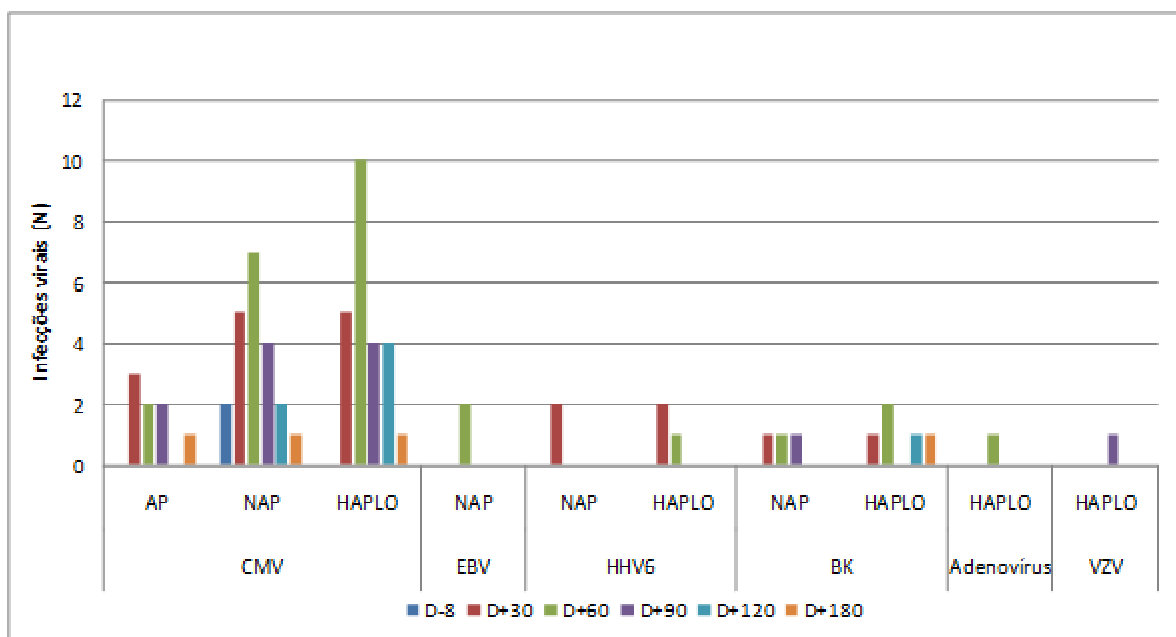


Figura 5.30: Detecção de infecções e reativações virais ao longo do acompanhamento pós-TCTH.

Ao avaliarmos o impacto potencial da reconstituição de subpopulações celulares específicas na reativação viral, decidimos usar como variável de comparação os valores absolutos, percentuais e categorizados dessas subpopulações no D+30, em relação à reativação viral (em geral, considerando todos os vírus detectados) e do CMV nos diferentes dias pós-transplantes.

As subpopulações cujos valores no D+30 mostraram associação ou tendência com a reativação de qualquer um dos vírus estudados no presente trabalho foram linfócitos T CD4+ TCR $\alpha\beta$ + ($p= 0,027$, porcentagens diminuídas); linfócitos T CD4+ CD28+ ($p= 0,016$ e $0,045$; porcentagens e valores absolutos diminuídos) e linfócitos T CD4+CD45RO ($p= 0,047$, porcentagens diminuídas, teste de Mann-Whitney) (Figura 5.31)

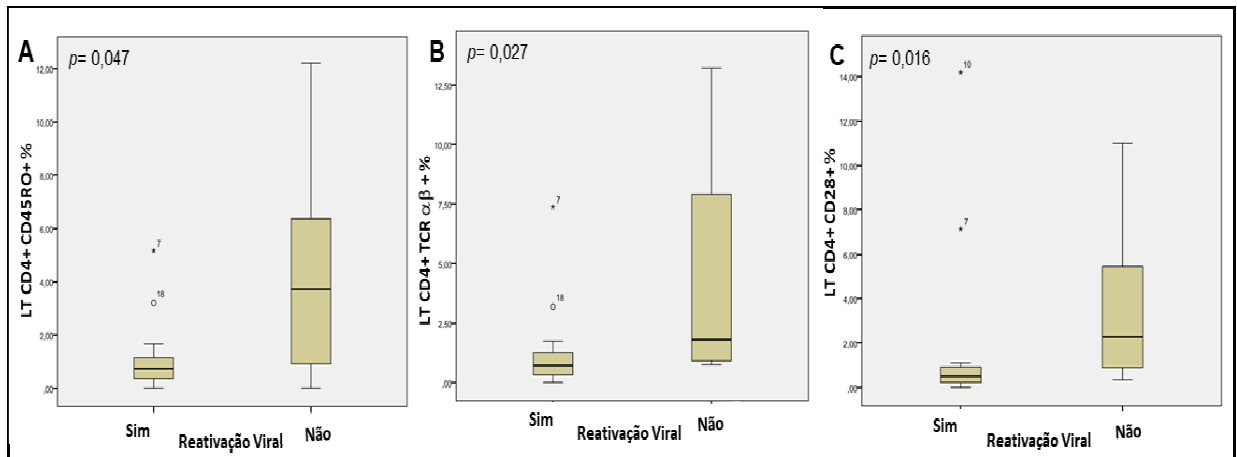


Figura 5.31: Gráficos de boxplot representando a variação das quantificações de subpopulações CD4+ no D+30 pós TCTH, de acordo com a reativação viral em qualquer ponto do acompanhamento pós-transplante. A) Porcentagens de linfócitos T CD4 CD45RO+; B) Porcentagens de linfócitos T CD4+TCR αβ; C) Valores absolutos de linfócitos T CD4+CD28+. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. Os valores com asteriscos são considerados *outliers*.

As subpopulações cujos valores no D+30 mostraram associação ou tendência com a reativação do CMV ao longo do acompanhamento no pós-transplante foram as células T CD4+ ($p= 0,05$, porcentagens diminuídas); CD4+CD28+ ($p= 0,017$ e $0,041$; porcentagens e valores absolutos diminuídos, e CD4+CD45RO ($p= 0,049$ e $0,063$; porcentagens e valores absolutos diminuídos; teste de Mann-Withney) (Figura 5.32).

teste de Mann-Withney "boxplot VIRUS

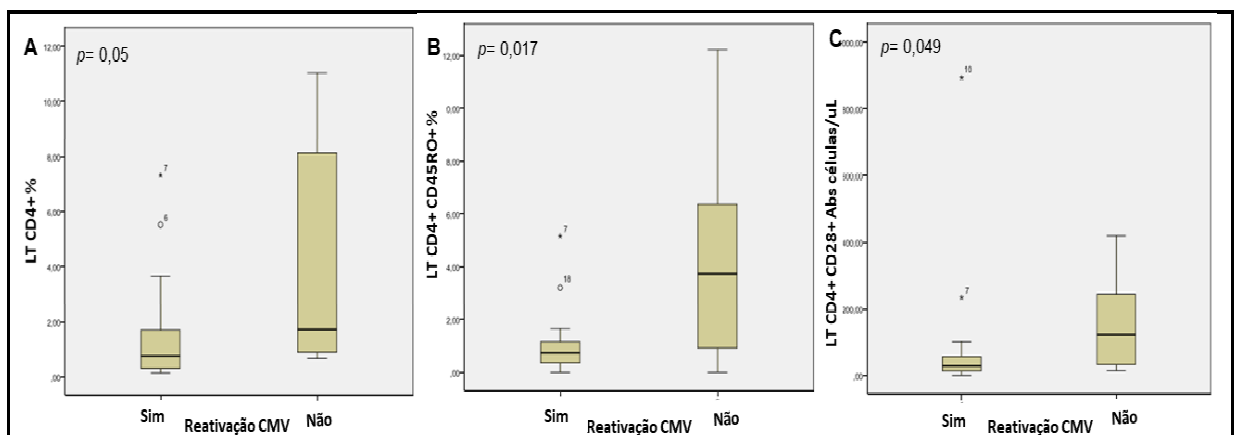


Figura 5.32: Gráficos de boxplot representando a variação das quantificações de subpopulações CD4+ no D+30 após-TCTH, de acordo com a reativação do CMV em qualquer ponto do acompanhamento pós-transplante. A) Porcentagens de linfócitos T CD4+; B) Porcentagens de linfócitos T CD4+ CD45RO; C) Valores absolutos de linfócitos T CD4+CD28+. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. Os valores com asteriscos são considerados *outliers*.

Quando foram considerados os vírus em geral, uma diminuição da subpopulação CD4+CD28+ no D+30, tanto a nível percentual como de valores absolutos, foi associada à infecção/reativação viral nos D+30 e D+60 ($p > 0,05$) (Figura 5.33).

Associadas a infecção/reativação viral no D+90 encontraram-se várias populações, todas com valores diminuídos no D+30, a saber: CD4+ percentual e absoluto ($p = 0,004$ e $p = 0,027$), CD8+ $\alpha\beta$ percentual ($p = 0,031$), CD4+CD45RO+ percentual e absoluto ($p = 0,005$ e $p = 0,05$) e CD4+CD28+ percentual ($p = 0,037$). De maneira interessante, a população CD4+CD45RA+ encontrou-se aumentada nos casos com reativação viral no D+180 ($p = 0,014$ e $p = 0,031$) (Figura 5.33).

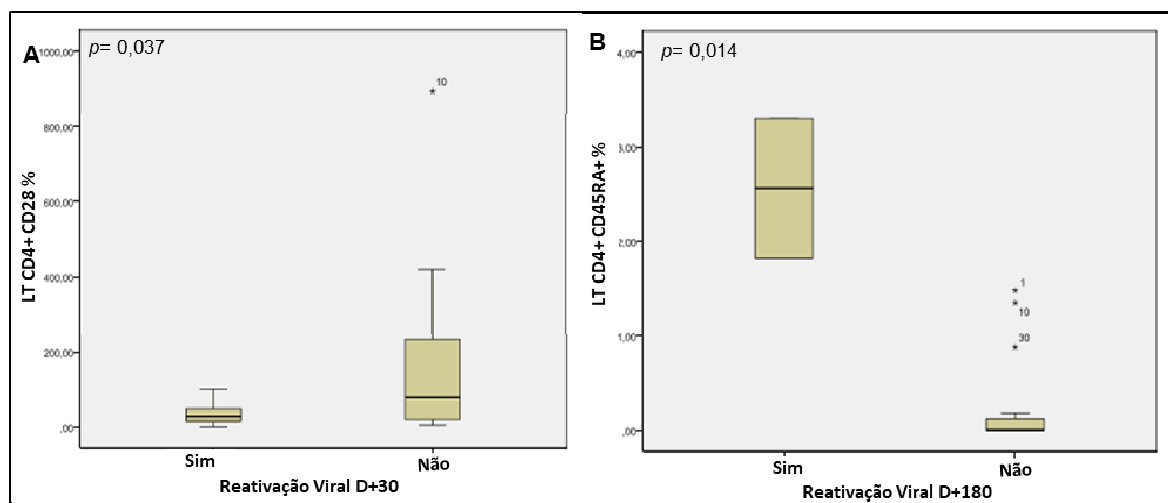


Figura 5.33: Gráficos de boxplot representando a variação das quantificações de subpopulações CD4+ após transplante, de acordo com a reativação viral no D+30 e D+180 no acompanhamento pós-transplante. A) valor absoluto de linfócitos T CD4+ CD28+; B) Porcentagens de linfócitos T CD4+ CD45RO. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. Os valores com asteriscos são considerados *outliers*.

Para a reativação no D+30 não foram identificadas associações significativas. Associadas com a reativação do CMV D+60 foram identificadas as células T CD4+ ($p = 0,058$, percentagens diminuídas); CD4+CD45RO ($p = 0,08$ e $0,05$; percentagens e valores absolutos diminuídos); CD4+CD28+ ($p = 0,014$ e $0,027$; percentagens e valores absolutos diminuídos). Para o CMV D+90, foram identificadas as células T CD4+ ($p = 0,049$, percentagens diminuídas); CD4+CD45RO ($p = 0,046$; percentagens diminuídas) e finalmente par

a o D+180, as subpopulações CD4+CD45RA encontraram-se aumentadas nos casos com reativação do CMV ($p= 0,014$ e $p= 0,031$; porcentagens e valores absolutos) (Figura 5.34).

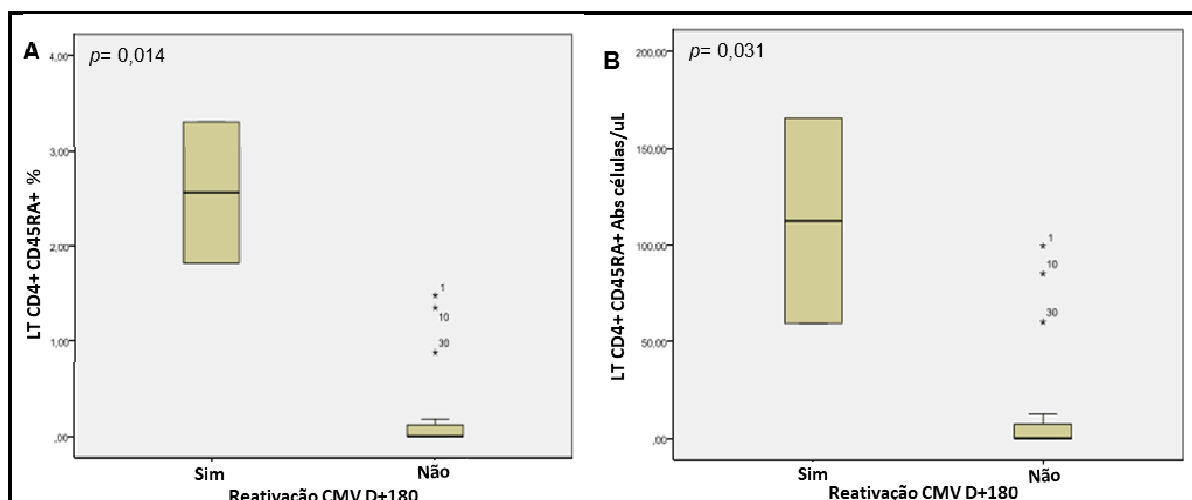


Figura 5.34: Gráficos de boxplot representando a variação das quantificações de subpopulações CD4+ após transplante, de acordo com a reativação do CMV no D+180 no acompanhamento do transplante. A) Porcentagens de linfócitos T CD4+ CD45RA+; B) valores absolutos de linfócitos T CD4+ CD45RA+. A linha dentro das caixas representa o valor da mediana, as caixas a variação do primeiro ao terceiro quartil e as barras representam a amplitude da variabilidade fora dos quartis superior e inferior. Os valores com asteriscos são considerados *outliers*.

5.19 Análise de Sobrevida global e risco de reativação viral

Dos 31 pacientes incluídos neste estudo, 8 foram a óbito: 1 no grupo dos transplantes AP (14%), 3 no NAP (25%) e 4 no haplo (33%). A probabilidade de sobrevida global do grupo foi de 77% (1 -23 meses, mediana 13,5).

Não houve diferenças na SG dos três tipos de transplante, embora o transplante AP tenha mostrado melhores curvas, como esperado (Figura 5.35) ($p= 0,773$, log-rank test).

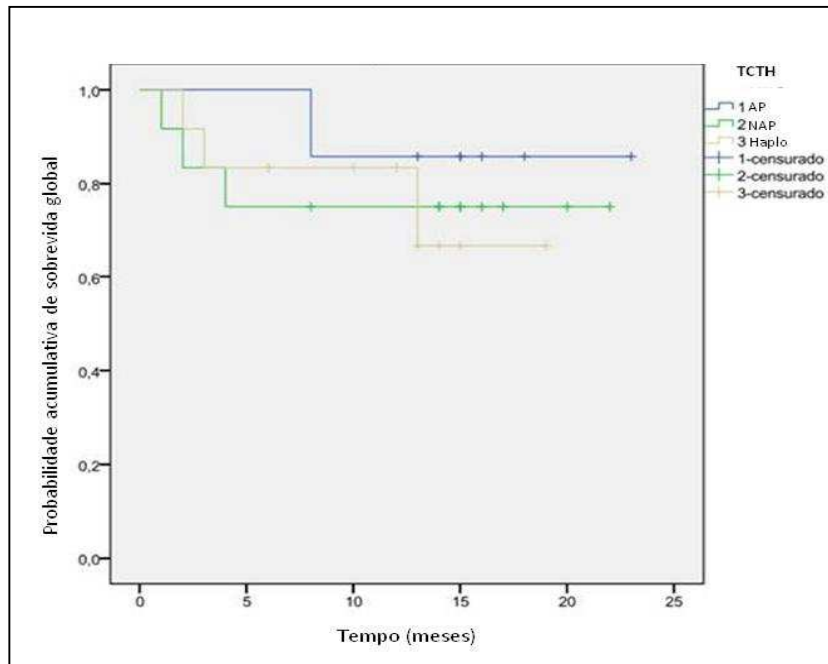


Figura 5.35: Probabilidade acumulativa de sobrevida global em pacientes submetidos a TCTH diferenciado em transplante AP, NAP e HAPLO (Testes de Kaplan-Meier).

Em relação às infecções virais, considerando os vírus estudados no presente trabalho ter tido um ou mais eventos de infecção/reativação viral foi associado com uma porcentagem de SG menor (74% vs. 87,5% para os pacientes que não tiveram eventos de infecção viral), porém sem significação estatística ($p= 0,340$, teste de log-rank) (Figura 5.36). Similares valores foram observados quando considerado apenas o CMV em qualquer tempo após o transplante.

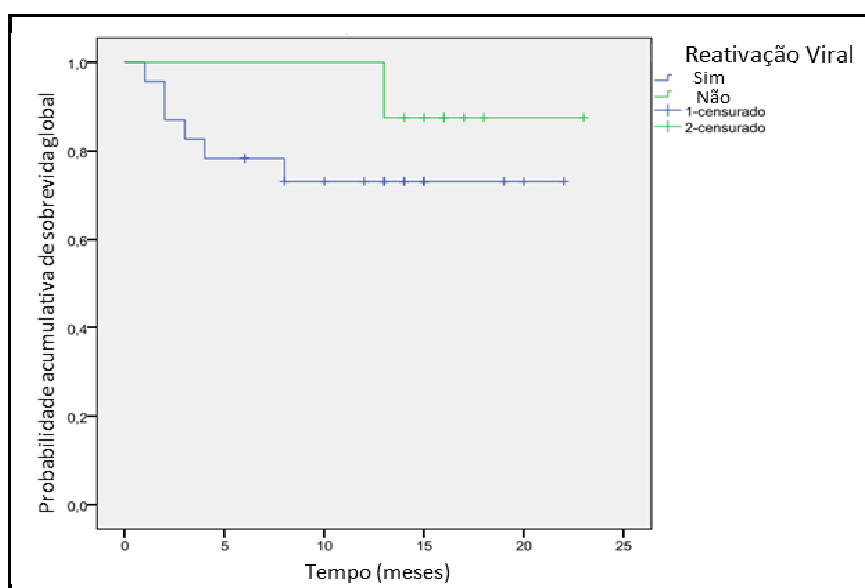


Figura 5.36: Probabilidade acumulativa de sobrevida global de acordo com a detecção da reativação viral em qualquer tempo no pós-transplante (Teste Kaplan-Meier).

Em relação ao papel das subpopulações imunes como preditoras da SG do grupo, uma quantidade de linfócitos T CD8+ $\alpha\beta$ superior à média do grupo no D+30 (208 células/uL), foi associada com uma melhor SG (100%), quando comparado com o observado nos casos que tiveram valores abaixo da média (73,3%) ($p= 0,078$; teste de log-rank) (Figura 5.37).

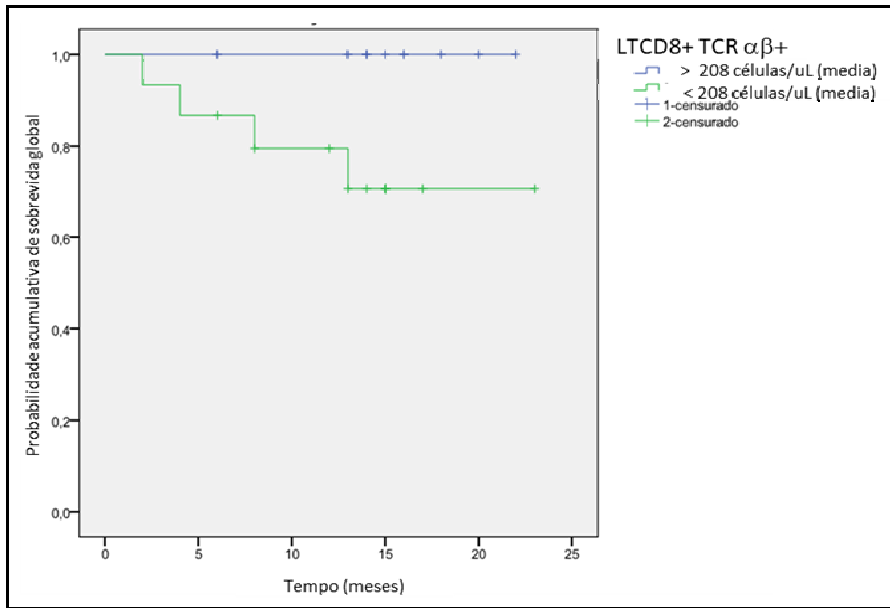


Figura 5.37: Probabilidade acumulativa de sobrevivência global em pacientes submetidos TCTH, de acordo com os níveis de linfócitos T CD8+ $\alpha\beta$: categorizados pela média do grupo no D+30 (208 células/uL) (Teste de Kaplan-Meier).

Pacientes com valores de linfócitos T CD8+CD45RA+ (efetoras) maiores que a média do grupo (144 células /ul) no D+30 mostraram uma SG inferior aos que tiveram valores menores (90,5% vs. 37%) ($p= 0,009$). Esta tendência foi similar quando considerada a relação CD45RA/RO nas células T CD8+ ($p< 0,001$) (Figura 5.38). O baixo número de casos no grupo com altos valores indica a necessidade de continuar estudando esta população e sua relação com o desfecho do transplante.

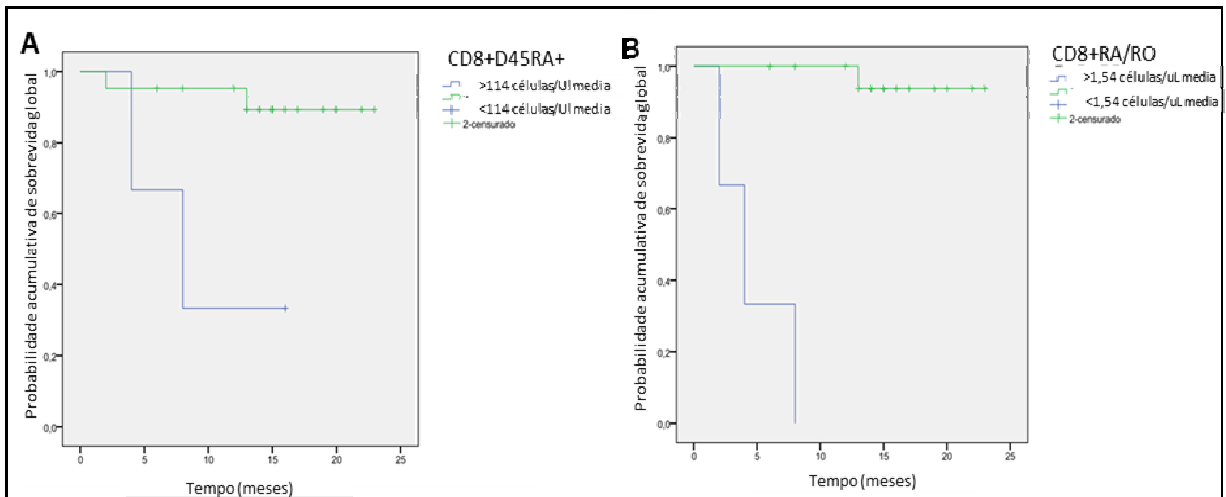


Figura 5.38: Probabilidade acumulativa de sobrevida global em pacientes submetidos TCTH.(A) valores de linfócitos T CD8+CD45RA+ *naive* maiores ou menores que média do grupo (144 células /ul) no D+30 ($p= 0,009$); (B) Proporção dos linfócitos T CD8+RA/RO (efetores/memória) categorizados de acordo com a média do grupo (1,54 células /ul) no D+30 ($p< 0,001$) (Teste de Kaplan-Meier).

Já em relação às células NK, casos com maior número de células NK (>279 cels/ul, média do grupo) tiveram uma SG melhor (100% vs 77,8% para os casos com valores menores) porém sem significância estatística ($p= 0,163$. log-rank test) (Figura 5.39).

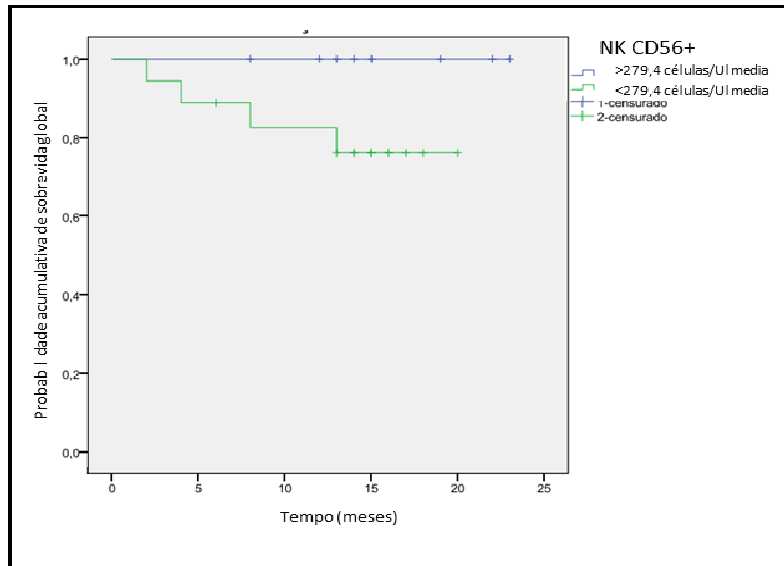


Figura 5.39: Probabilidade acumulativa de sobrevida global em pacientes submetidos TCTH com valores células NK categorizadas de acordo com a média do grupo no D+30 (279,4 células/uL) (Teste Kaplan-Meier).

Entretanto, o tipo de transplante influenciou a probabilidade de reativação do CMV ao longo do tempo pós-transplante, com probabilidades menores para o transplante AP quando comparado com os transplantes NAP e haplo. O risco acumulativo de reativação do CMV foi similar para os transplantes NAP e haplo nos

primeiros 90 dias pós-transplante, mas aumentou após esta data para o transplante haplo porém sem significância estatística ($p= 0,08$; log-rank test) (Figura 5.40).

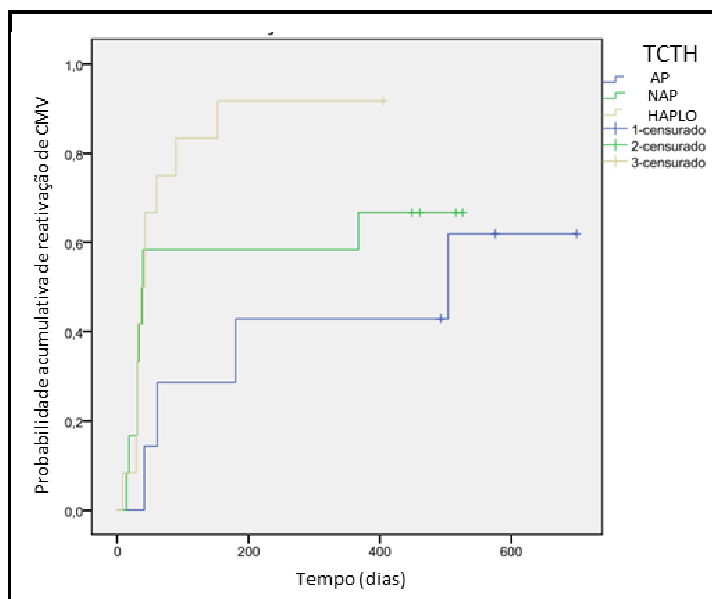


Figura 5.40: Probabilidade acumulativa de reativação viral do CMV ao longo do tempo pós-transplante. A linha de cor azul corresponde ao transplante AP, verde transplante NAP e amarela transplante Haplo ($p= 0,08$; log-rank test).

Em relação às subpopulações imunes e o risco de reativação do CMV, casos com PLM $>0,70$ (maior número de linfócitos em relação aos monócitos) no D+30 mostraram uma tendência a aumentar o risco de reativação de vírus em geral ($p= 0,072$) (Figura 5.41)

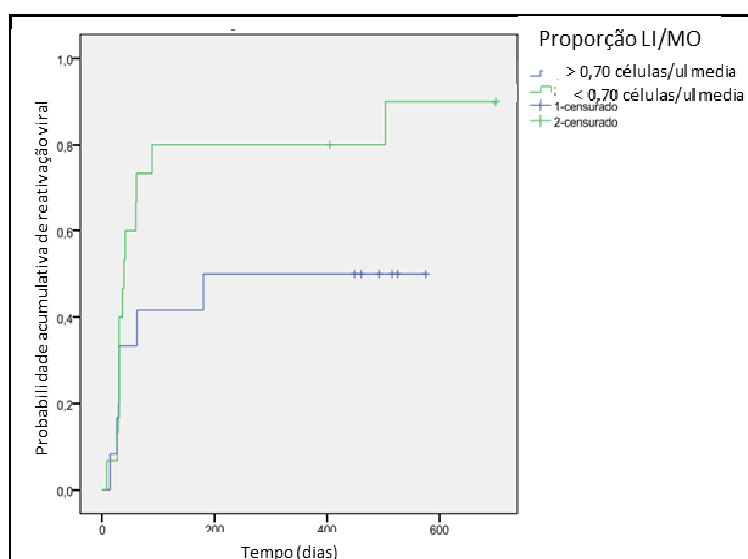


Figura 5.41: Probabilidade acumulativa de reativação viral ao longo do tempo pós-transplante, de acordo com PLM $>$ ou $<$ 0,70 no D+30 ($p= 0,072$; log-rank test).

Casos com valores de linfócitos T CD4+ < 114,5 (média) no D+30 mostraram uma tendência a aumentar o risco de reativação do CMV ao longo do acompanhamento ($p= 0,109$) (Figura 5.42)

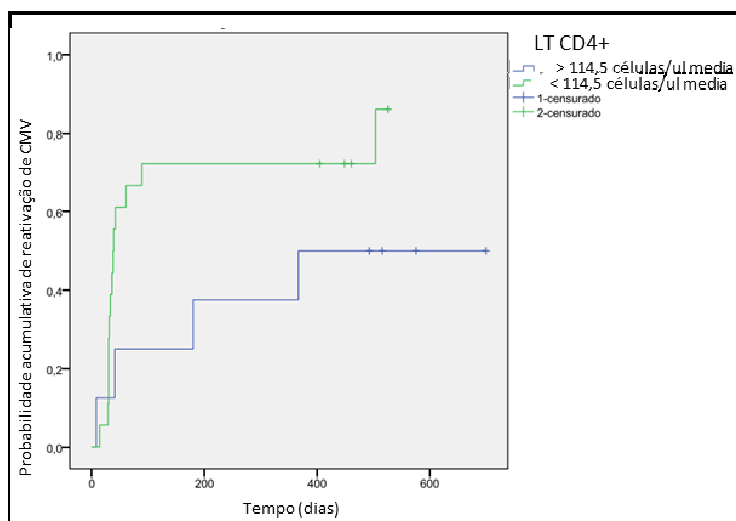


Figura 5.42: Probabilidade acumulativa de reativação do CMV ao longo do tempo pós-transplante com valores de linfócitos T CD4+ > ou < 114,5 células/uL da média. Sem significância estatística ($p= 0,109$).

Níveis baixos de linfócitos T CD4+ com expressão do co-ativador CD28, assim como os linfócitos T CD4+CD45RO+ estiveram associados a um aumento do risco da reativação do CMV ao longo dos acompanhamentos. Valores de linfócitos T CD4+CD28+ < 112 (média) no D+30 foram associados a maior risco de reativação do CMV ao longo do acompanhamento (83,3% vs 28,6% para os casos com altos níveis de células T CD4+CD28+; $p= 0,014$) (HR 5,05 IC95% 1,14 -22; $p= 0,033$. Análise de regressão de Cox) (Figura 5.43).

Casos exibindo níveis baixos de linfócitos T CD4+CD45RO+ (< 96,5; valor médio) no D+30 tiveram maior risco de reativação do CMV ao longo do acompanhamento (83,3% vs. 37,5%; $p= 0,01$) (HR 4,5 IC95% 1,27-15,6; $p= 0,02$. Análise de regressão de Cox) (Figura 5.43)

A reativação viral em geral também foi influenciada pelos valores das células CD4+CD28+ ($p= 0,014$) e CD45RO CD4+ ($p= 0,013$) (Figura 5.43).

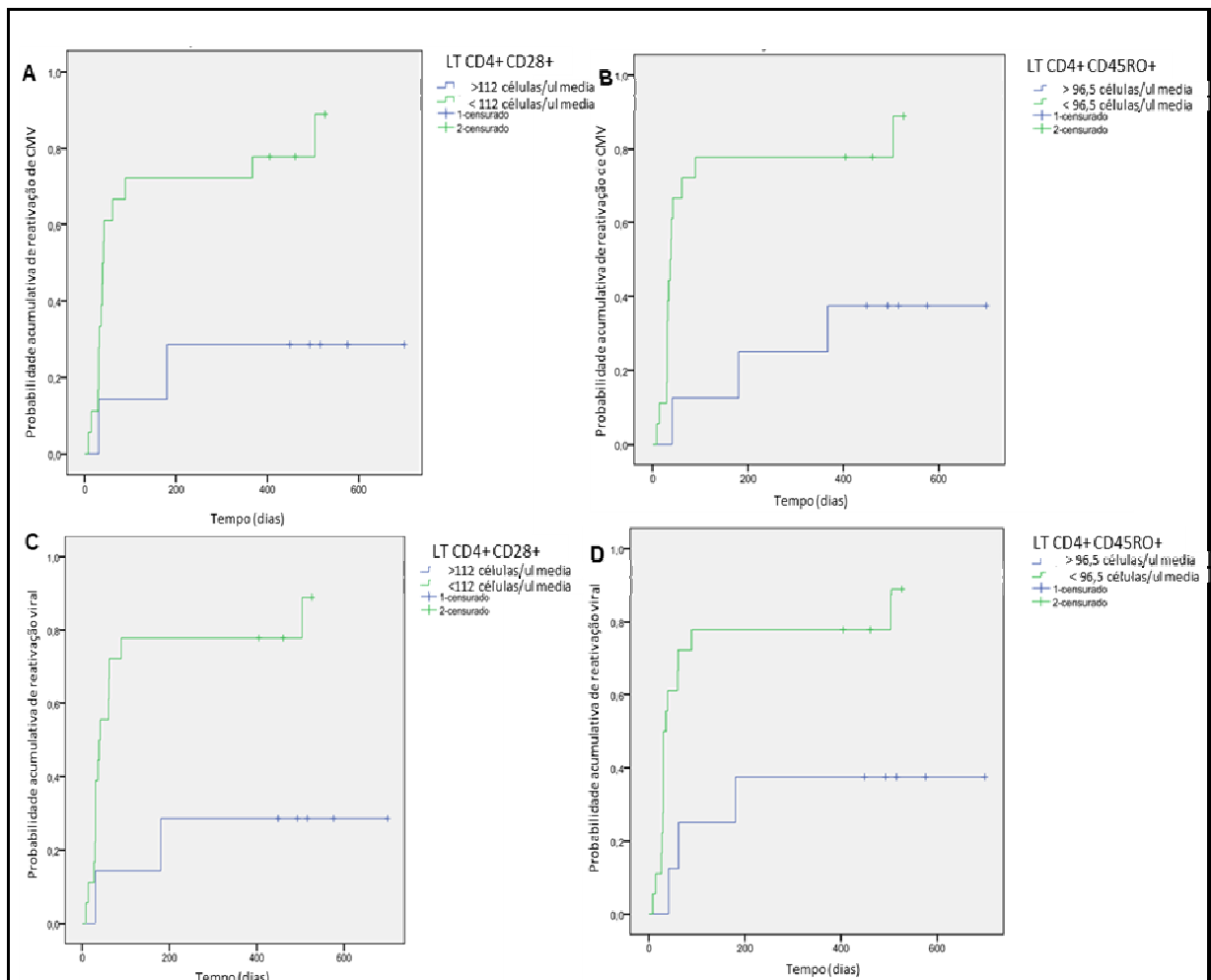


Figura 5.43: Probabilidade acumulativa de reativação do CMV e reativação viral ao longo do tempo pós-transplante categorizados. Probabilidade acumulativa de reativação do CMV e reativação viral ao longo do tempo pós-transplante categorizados: A) Valores de linfócitos T CD4+CD28+ >/< 112 (média) no D+30 ($p= 0,014$). B) valores de linfócitos T CD4+CD45RO+ >/< 96,5 (média) no D+30 ($p= 0,01$). C e D) valores das células CD4+CD28+ ($p= 0,014$) e CD45RO CD4+ ($p= 0,013$) em relação à reativação viral.

6 DISCUSSÃO

A reconstituição celular imune após o TCTH alogênico e suas características são reconhecidas como fatores determinantes de morbi-mortalidade por infecções oportunistas, bem como da doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) nos receptores do TCTH (SCHULTZ *et al.*, 2006). Durante a última década, diferentes protocolos de TCTH haploidêntico são cada vez mais utilizados como terapia curativa para pacientes com neoplasias hematológicas, especialmente para aqueles que não têm doador HLA-idêntico (SEGGEWIS R *et al.*, 2010). Os resultados clínicos do TCTH haploidêntico são promissores, entretanto esta modalidade de transplante ainda está sujeita a uma série de complicações precoces e tardias como infecções oportunistas e recidiva da doença resultantes da lenta reconstituição imune (KONING C *et al.*, 2018).

Neste estudo, descrevemos em detalhes a reconstituição imune de subpopulações celulares leucocitárias no sangue periférico de receptores de TCTH alogênico de medula óssea ou sangue periférico, a partir de doadores HLA-idêntico (aparentado e não aparentado) o de doador HLA-haploidêntico. O objetivo principal do estudo foi descrever as relações entre as populações celulares e as infecções/reativações virais, durante os primeiros 180 dias do transplante.

Em nosso estudo encontramos diferentes cinéticas de recuperação após o TCTH para as grandes populações linfocitárias. As células NK foram as primeiras a recuperar, seguida pelos linfócitos T CD8+, linfócitos B CD19+ e finalmente os linfócitos T auxiliares CD4+. Estas cinéticas de recuperação estão de acordo com as descritas por Pei *et al* (2015). A diferença principal com outros estudos é que estes tiveram primeiro uma recuperação dos linfócitos T auxiliares CD4+ e por último dos linfócitos B (ZHU *et al*, 2010; BORAE G *et al.*, 2015).

Os monócitos são células que compõem o sistema fagocitário, trafegando normalmente entre a corrente sanguínea e os tecidos. Sua frequência e cinética de co-circulação encontram-se aumentadas durante processos inflamatórios (SHI and PAMER, 2011). Essas células desempenham papéis-chave na homeostase tecidual, iniciando e propagando as respostas contra patógenos e, em situações normais, participando da resolução das respostas imunes antes que ocorra dano tecidual excessivo (OLINGY CE *et al.*, 2019).

Em nosso grupo de estudo, os níveis dos monócitos se recuperaram rapidamente e persistiram em níveis superiores à média do grupo controle durante o

primeiro ano após TCTH nas três modalidades de transplante. Similares resultados foram observados em diferentes estudos prévios (PEI *et al.*, 2015; BORAE G *et al.*, 2015), sugerindo que os monócitos sofrem impacto dos processos inflamatórios subjacentes ao transplante.

A proporção entre linfócitos e monócitos (PLM) é um índice que vem sendo usado como indicador de inflamação e prognóstico clínico em vários tipos de cânceres e condições inflamatórias não neoplásicas (LU *et al.*; 2017; TAN *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019) no contexto das intervenções cirúrgicas (PAN *et al.*, 2018). Assim, decidimos realizar uma análise da PLM nas diferentes modalidades de transplante, analisando especificamente o D+30 por se tratar do primeiro ponto no pós-transplante que poderia fornecer informação precoce sobre o valor deste indicador. Os resultados mostraram que todas as modalidades de transplante tiveram uma PLM <1 (maior número de monócitos que de linfócitos), resultado esperado a partir do comportamento dessas duas populações por separado. O transplante haploidêntico, especialmente, exibiu os menores valores encontrados no estudo. Neste trabalho, pela primeira vez descrevemos uma associação entre baixos valores de PLM no D+30 e risco de reativação do CMV. Embora estatisticamente marginal, e limitado pelo baixo número de casos estudados, que restringiu o poder estatístico da análise e impediu a avaliação do impacto nas diferentes modalidades de transplante, nossos resultados mostram a relevância de avaliar esta relação no acompanhamento pós transplante em estudos futuros. Foco especial deveria ser dado ao TCTH haploidêntico, por ter apresentado os menores índices PLM dentre os estudados. Além disso, seria interessante caracterizar as sub-populações monocíticas que são responsáveis pela monocitose relativa no pós-transplante, pois hoje se sabe que diferentes *subsets* de monócitos podem ter funções diversas na resposta imune e no câncer (OLINGY CE *et al.*, 2019).

As células NK são capazes de produzir citocinas em altos níveis e, portanto, têm um importante papel na regulação da hematopoiese, assim como no amadurecimento e diferenciação linfocitária (KONING C *et al.*, 2018). As células NK caracteristicamente apresentam o fenótipo CD3⁻CD16⁻CD56⁺ e já foi definido que são as primeiras a recuperar valores normais no pós-transplante precoce (LIA *et al.*, 2016). Além disso, estas células são importantes no início da recuperação imunológica e na proteção contra infecções (SEGGEWIS, 2010 SIMONETTA F, 2017). Em relação à DECH, o papel das células NK parece ser tanto de promover

alo-reatividade como de modular a resposta T citotóxica mediante os efeitos sobre populações T específicas (SIMONETTA *et al.*, 2017). A participação nas células NK no efeito GvL está bem documentada, sendo na atualidade uma fonte promissora de imunoterapias adotivas para o tratamento de leucemias (SILLA, 2016; BAGGIO *et al.*, 2017).

Os pacientes submetidos ao transplante alogênico no presente trabalho, apresentaram uma expansão rápida das populações de células NK imaturas CD56⁺CD16⁻ durante o tempo de acompanhamento. Já a cinética de formação das células NK maduras (ativadas) CD56⁺CD16⁺ foi muito mais lenta, permanecendo no limite inferior dos valores do grupo controles. Esta distorção da composição do compartimento periférico de células NK já foi observada em outros estudos e se mantém durante o primeiro ano de evolução pós-TCTH alogênicos (SEGGEWIS, 2010; KONING C *et al.*, 2018), sugerindo um papel das células imaturas produtoras de interleucinas na sustentação da recuperação hematopoiética pós-transplante.

Em nosso estudo, a cinética de recuperação da contagem de células NK foi mais rápida no transplante NAP, seguido do transplante haploidêntico e finalizando com o transplante AP. Boraie *et al.* (2015) observou os mesmos padrões, documentando uma melhor recuperação no grupo de transplante NAP seguido do transplante haploidêntico. Isto sugere uma relação entre o nível de disparidade HLA e a recuperação das células NK, em que precocemente estas células poderiam estar exercendo um papel modulador sobre as células T, impedindo uma alo-reatividade exacerbada (SIMONETTA *et al.*, 2017).

Em termos da sobrevida global (SG), nós achamos uma tendência a que casos com maior número de células NK no D+30 tenham uma SG melhor ($p=0,163$). Uma associação significativa da mesma natureza foi também observada no estudo de LIA M *et al.*, 2016, onde valores maiores à média do grupo de células NK no D+30 tiveram uma SG melhor. A continuação dos nossos estudos é da maior relevância, pois sendo a primeira população a se reconstituir pós-transplante, poderia se tornar um marcador precoce do desfecho geral do transplante.

Avaliando a cinética dos linfócitos T totais (CD3⁺) verificou-se uma diminuição no D+30 em todos os pacientes submetidos a TCTH tanto no grupo HLA-idêntico (AP e NAP) como no grupo haploidêntico, encontrando uma tendência à diminuição no D+30 nos pacientes haploidêntico em relação ao grupo AP e NAP, como foi encontrado por estudos prévios (BOREA *et al.*, 2015; CORNELISSEN J, 2002; SEGGEWIS R, 2010; TOUBERT A, 2012). Além disso, houve um aumento

estatisticamente significativo na reconstituição dos linfócitos T CD3+ no D+120 nos pacientes haploidêntico em relação aos grupos de pacientes submetido a TCTH HLA-idêntico (AP e NAP).

O processo de reconstituição dos componentes linfocitários no pós-TCTH caracteriza-se pelo rápido surgimento de linfócitos T CD8+ (KONING C et al., 2018). Diversos estudos sugerem que a rápida recuperação destas células ocorre através de um caminho alternativo de imunorreconstituição, denominado expansão homeostática periférica, resultando em uma expansão clonal das células do doador infundidas no momento do TCTH, ou através de células residuais do hospedeiro que respondem a citocinas e/ou a antígenos (PEI *et al.*, 2015; KONING C *et al.*, 2018). Em nosso estudo, a cinética de recuperação dos linfócitos T citotóxicos CD8+ foi muito mais rápida que os linfócitos T CD4+, mostrando uma tendência crescente constante nos pacientes submetidos a transplante haploidêntico a partir do D+90 até o último ponto de acompanhamento no D+180.

Em consonância com o papel principal que se sabe os linfócitos T citóxicos têm na patogênese da DECHa (ZEISER R and BLAZAR BR, 2017), o número de linfócitos T CD8+ no D+30 foi associado marginalmente com o desenvolvimento da DECH ($p= 0,052$), e tanto os valores percentuais, como absolutos foram associados com a DECHa severa ($p= 0,028$ e $p= 0,021$ respectivamente). Esta associação já tinha sido identificada em diferentes estudos prévios (FERRERA J, 2009; BORAE G *et al.*, 2015). No entanto, no estudo de PEI *et al* (2017) não foi encontrada qualquer relação entre o número de linfócitos T CD8+ com desenvolvimento de DECHa severa (graus III/IV). Devido ao baixo número de casos incluídos no presente estudo, levantamos uma nota de cautela sobre as associações encontradas, sendo necessário aumentar o número amostral antes de firmar um papel dos níveis de linfócitos CD8+ na predição do risco da DECH em nosso Centro.

Em relação às infecções virais, objetivo primário do trabalho, apesar do papel reconhecido das células T citotóxicas CD8+ no controle das infecções, não foram achadas associações significativas dos níveis percentuais ou absolutos, lineares ou categorizados, com a taxa ou o risco de reativação ou infecção viral.

Entretanto, quando as células T CD8+ foram categorizadas em relação ao estado funcional (memória x naive/efetora) baseado na expressão de marcadores CD45 RO e RA, observamos que pacientes com níveis maiores de linfócitos T CD8+ CD8+CD45RA+ ou uma relação CD8+ CD45RA/RO maior que a média no D+30 foi significativamente associada com uma SG menor, indicando a importância do estado

funcional dos linfócitos CD8+, e a recuperação das células de memória no desfecho do transplante como modalidade terapêutica.

A população T CD8+ $\gamma\delta$ mostrou associações significativas no presente trabalho. Em primeiro lugar, teve uma recuperação rápida no pós-transplante precoce (D+30), especialmente na modalidade haploidêmica, exibindo uma cinética bimodal em M nos transplantes haploidêmicos e NAP, com decréscimo a partir do D+90. Os níveis dessas células do D+30 tiveram uma associação significativa com o desenvolvimento da DECHa. Estudos prévios relataram um efeito "benéfico" dessas células no pós-TCTH, como por exemplo, um aumento da frequência de células T $\gamma\delta$ em sobreviventes do TCTH de doador AP, assim como melhora na sobrevida global de pacientes submetidos a transplante AP e haploidêmico e (FARNAULT L *et al.*, 2013; LOCATELLI F *et al.*, 2013). O estudo de Perko *et al* (2015) é o primeiro a sugerir que a reconstituição precoce das células T $\gamma\delta$ após o TCTH está associada com a diminuição do risco de infecções e a sobrevida em pacientes pediátricos submetidos TCTH a AP, NAP e haploidêmico. Nossos resultados não mostraram associações com taxa de infecção e sobrevida, o que poderia ser devido a que nos trabalhos supracitados, a maneira de quantificar a população $\gamma\delta$ é através da expressão do receptor nas células CD3+, e nossos resultados se referem à população CD8+TCR $\gamma\delta$. Assim, o aumento do número amostral e uma melhor definição das sub-populações $\gamma\delta$ poderia esclarecer aspectos aparentemente contrastantes do papel dessas células nos processos imuno-mediados no pós-TCTH.

As infecções causam grande preocupação no pós-TCTH alogênico. Estudos relataram que a incidência de infecções atinge mais de 75% dos pacientes e a mortalidade relacionada às infecções pode chegar a 20% no pós-TCTH (DUINHOUWER *et al*, 2017). O monitoramento frequente infecção/reativação viral TCTH, fornecendo uma base para a terapia preventiva para evitar complicações clínicas (MEIJER E *et al.*, 2003). Mesmo com o uso de terapias antivirais preemptivas, a reativação do CMV ocorre frequentemente dentro dos primeiros 100 dias pós-TCTH, devido aos regimes imunossupressivos (LJUNGMAN *et al*, 2011). A viremia do CMV está associada com defeitos profundos na reconstituição imune e com uma mortalidade relacionada ao transplante elevada (SUESSMUTH *et al*, 2015; OGONEK *et al*, 2016; TEIRA *et al*, 2016).

Em nosso estudo, baseado no acompanhamento dos pacientes nos primeiros 180 dias; dentro dos 31 pacientes estudados em 74% dos casos foram documentados um ou mais eventos de infecção viral, por um ou mais vírus, durante o tempo de acompanhamento, sendo o CMV o principal agente detectado nos pacientes. O maior número de eventos foi encontrado no transplante haploidêntico, seguido do NAP e finalizando pelo AP, como esperado. Entretanto, não houve diferenças significativas nas frequências de reativação/infecção viral entre as três modalidades de transplante ($p= 0,22$).

No presente trabalho, os números de linfócitos T CD4+ mostraram uma associação significativa com a reativação/infecção viral ao longo do acompanhamento, assim como com o risco de reativação viral. As células T CD4+ do sistema imune adaptativo incluem células T reguladoras (Treg) e células T efetoras auxiliares (células Th), e desempenham papéis importantes na resposta imune do hospedeiro contra patógenos e na inflamação (ZHU J *et al.*, 2010).

Os papéis das células T CD4+ efetoras no controle da infecção são amplos e variados. A função de células T CD4+ é tradicionalmente definida pelo fornecimento de auxílio a outras células efetoras, como aumento da resposta de células T CD8+, promoção de memória de células T CD8+, aumento de atividade fagocítica ou oxidativa de células mielóides e auxílio às células B. Estas funções são mediadas por *subsets* de células T CD4+ específicos, tais como células auxiliares Tipo 1 (Th1), Tipo 2 (Th2), Tipo 17 (Th17), células T reguladoras (Treg), T foliculares auxiliares (Tfh) e células T CD4+ citotóxicas (ZHU J *et al.*, 2010; SALLUSTO F. 2016).

Os linfócitos Treg, por sua vez, modulam a função dos linfócitos T e B, e das células dendríticas através de interações celulares e produção de citocinas inibitórias como IL10 e TGF β (VIGNALLI DA *et al.*, 2008).

A diferenciação das células T CD4+ em uma dessas linhagens é influenciada pelos sinais recebidos durante a interação com células apresentadoras de antígenos (APC), incluindo citocinas, sinais coestimulatórios e sinais derivados do receptor de células T (TCR) (O'SHEA, 2010).

Desta maneira, as células T CD4+ estão envolvidas no controle das infecções, mas também são influenciadas pelo tipo de antígeno e a sua disponibilidade (infecções agudas x crônicas) (VELLA *et al.*, 2017).

No transplante de progenitores hematopoéticos, a situação é complicada pela complexidade dos processos imuno-mediados no contexto da ressetagem do sistema imune e da memória central em meio a processos inflamatórios em curso, variáveis de acordo com o grau de alo-disparidade e os condicionamentos instituídos. No caso do CMV, já foi demonstrado a reconstituição imune precoce de células T específicas para CMV é fundamental para o controle viral (LJUNGMAN *et al.*, 2011; OGONEK *et al.*, 2016).

Em relação aos transplantes, um estudo descreveu que, em comparação com receptores de TCTH HLA-idêntico, os receptores haploidênticos tiveram menores contagens de células T CD4+ e suas linhagens antes do D+90, bem como maior expressão de CD28+ nas células T CD4+ e CD8+. Entretanto, as células T foram igualmente funcionais nos dois grupos de TCTH no D+30 (CHANG *et al.*, 2011). Em consonância, inicialmente em nosso estudo a cinética de recuperação dos linfócitos T CD4+ mostrou uma tendência decrescente onde houve uma diminuição no D+30 nos grupos de pacientes submetidos a TCTH NAP e haploidêntico, sendo este último grupo o que sofreu uma queda maior e significativa. Borea *et al.* (2015) descreveu uma marcada diminuição no D+30 nos três tipos de transplante, seguida de uma recuperação mais lenta foi no transplante haploidêntico. Assim, nossos resultados em relação à reconstituição das células CD4+ confirmam estudos anteriores e indicam que essa população é uma das mais afetadas no transplante haploidêntico. Nosso estudo também confirmou que a contagem de células T CD4+ tende a permanecer baixa por até 12 meses após o transplante, como descrito em estudos prévios (PEI *et al.*, 2015; BORAE G *et al.*, 2015).

Drylewicz *et al.*, (2016), relataram que, em contraste com o conceito geral do controle das infecções virais mediada preferencialmente por células citotóxicas, a reconstituição precoce das células T CD8+ não desempenha um papel no tempo de início das reativações virais. No entanto, a reconstituição adequada das células T CD4+, bem como das células NK estiveram significativamente associados a um menor risco de reativação do CMV após o TCTH. Em nosso estudo, as análises mostraram que casos com valores diminuídos de linfócitos T CD4+ $\alpha\beta$, linfócitos T CD4+ de memória e linfócitos T CD4+ expressando a molécula co-estimuladora CD28 no D+30 mostraram uma frequência maior de reativação viral em qualquer

tempo pós-TCTH; e esse mesmo efeito foi observado para a reativação do CMV. Descrevemos também associações particulares entre os níveis dessas sub-populações e os eventos virais no D+60 e D+90, mas consideramos que é necessário um aumento do número de pacientes acompanhados para firmar as associações descritas. As mesmas sub-populações associaram-se com uma tendência a aumentar o risco de reativação do CMV ao longo do acompanhamento, o que confirma os resultados anteriores e confere maior confiabilidade aos resultados, devido a que a análise foi realizada por métodos estatísticos de tempo-para-evento, que têm maior poder estatístico. Especificamente, níveis baixos de linfócitos CD4+CD45RO+ e CD4+CD28+ no D+30 estiveram associados a em média, entre 4 e 5 vezes mais risco de reativação do CMV. Estes resultados estão em concordância geral com aqueles que encontram um papel benéfico da recuperação rápida das células CD4+ (DRYLEWICZ *et al*, 2016; BERGER *et al.*, 2008). Um estudo prévio, que não tinha como objetivo o estudo de infecções virais, mostrou que pacientes com baixa contagem de células T CD4 + no dia 35 pós-TCTH tinham um risco maior de morrer por infecções (BERGER *et al.*, 2008). Nosso trabalho não avaliou esse desfecho, o que seria interessante para estudos futuros.

Na avaliação feita no estado funcional das sub-populações de linfócitos T CD4+ encontramos que os pacientes submetidos a TCTH-haploidêntico são aqueles com maior atraso da recuperação das contagens de células CD4+CD45RA+ em relação ao grupo de pacientes com transplante HLA-idêntico. Estes resultados são concordantes com estudos anteriores, como el de FORAZ *et al*, 2011 que mostraram uma recuperação tardia de este subgrupo de células efectoras com depleção de células T após um regime de condicionamento mieloablativo com ATG. A recuperação desta sub-população depende da ressetagem completa do sistema imune e pode estar afetada pelos efeitos dos condicionamentos no epitélio tímicos. O baixo número de casos estudados impediu a análise dos efeitos dos condicionamentos, o que seria interessante realizar em estudos futuros, visto o papel da demora na reconstituição dessa população no risco de reativação viral observada no presente estudo.

Os compartimentos de linfócitos T CD4+ e CD8+ em recuperação foram também avaliados em relação à expressão de marcadores de competência e de ativação. Foi primeiro analisada a frequência de células com expressão de CD28, um receptor do co-estímulo pelo B7 das APCs e células B essencial à ativação das células T mediada pelo TCR (CHOI B; 2002). O CD28 é expresso constitutivamente

em condições normais por cerca de 80 a 100% das células T CD4+, e por 55 a 85% das CD8+ circulantes no sangue periférico. A frequência de células T CD4+ com expressão de CD28, apresentou-se nos dois grupos de transplante em níveis normais em todos os tempos da análise, o que significa que durante este processo, não houve um aumento de células T CD4+ potencialmente anérgicas devido à impossibilidade de recepção do co-estímulo de ativação. Como foi expresso anteriormente, níveis baixos de linfócitos T CD4+ CD28+ no D+30 estiveram associados a um aumento do risco da reativação viral e especificamente do CMV ao longo dos acompanhamentos.

Nos indivíduos imunocompetentes, a infecção pelo CMV resulta no acúmulo de células T tardiamente diferenciadas e uma relação aumentada de células T de memória para células T naive, com aproximadamente 10% das respostas de células T dedicadas a antígenos de CMV (SYLWESTER *et al*, 2005; DERHOVANESSIAN *et al*, 2011). As células T específicas para CMV são distribuídas nos subconjuntos quiescentes CD28 + CD45RA (memória central), bem como nas subpopulações efetoras CD28-CD45RA- (memória efetora) e CD28-CD45RA + (memória efetora RA). Estas células T efetoras tardias geralmente não mostram evidência de exaustão e retêm a funcionalidade (LA ROSA *et al*, 2017; JACKSON *et al*, 2017).

Outros estudos mostraram que as células T específicas do CMV apresentam um fenótipo único de células T “diferenciadas”, caracterizado pela perda de expressão dos receptores co-estimuladores CD27 e CD28 nas células T CD4 +, que se supõe surge após ciclos repetidos de estimulação antigênica (FLETCHER *et al*, 2005; VAN LEEUWEN *et al*, 2006; DERHOVANESSIAN *et al*, 2011; BURTON *et al*, 2019).

Assim, a associação do risco de reativação do CMV com a presença de níveis baixos de células CD4+ CD28+ pode ser devida a processos de imunomodulação mediados pelo CMV nas etapas precoces da reativação, ou alternativamente, à ausência de uma população CMV específica diferenciada no D+30. Dada a complexidade da resposta imune anti CMV, com a abordagem aqui utilizada não é possível distinguir entre estas possibilidades e não existem estudos anteriores avaliando o papel da expressão da molécula co-estimuladora CD28 no risco de reativação viral no transplante, de acordo com a nossa busca bibliográfica. O desenho de estudos que permitam a identificação e quantificação de populações CD4+ específicas do CMV permitirão entender melhor os resultados obtidos.

É importante ressaltar que nosso estudo teve várias limitações. Primeiro, devido ao curto período de tempo de recrutamento (dois anos) o número de casos não foi suficiente para realizar análises com alto poder estatístico. Pelo mesmo motivo, os dados de reconstituição imunológica não puderam ser adquiridos até o D+360, como inicialmente planejado. Entretanto, o estudo teve a vantagem de ser prospectivo, realizando em tempo real o acompanhamento dos desfechos principais nas variáveis analisadas no estudo. Os resultados obtidos são preliminares, mas abriram as portas para novas hipóteses e seguir explorando a dinâmica das subpopulações mais especificamente, nas suas relações com o risco das infecções virais e a identificação de marcadores precoces que permita um melhor manejo das complicações no pós-transplante.

7 CONCLUSÕES

1. As células NK foram as primeiras a recuperar, seguida pelos linfócitos T citotóxicos CD8+, linfócitos B CD19+ e finalmente os linfócitos T auxiliares CD4+ tanto no transplante HLA-idêntico como HLA-haploidêntico.
2. A recuperação imunológica em torno de valores de normalidade das células NK e NKT foi em torno ao D+30 pós TCTH tanto com doador HLA- idêntico como HLA- haploidêntico.
3. A recuperação de monócitos foi rápida, com normalização de valores para o D+30. Um maior número de monócitos em relação aos linfócitos no D+30 pós TCTH alogênico mostrou associação marginal com o aumento de risco de reativação viral.
4. O número de linfócitos T CD8+ e células T CD8 $\gamma\delta$ no D+30 teve relação com o desenvolvimento da DECHa severa (graus III/IV).
5. O tipo de transplante foi associado marginalmente à probabilidade de reativação do CMV ao longo do tempo pós-transplante, com probabilidades menores para o transplante AP quando comparado com os transplantes NAP e haploidêntico.
6. O número e tipo de células T CD4+ foi associado ao risco da infecção/reactivação viral, e da reativação do CMV especificamente.
7. Níveis baixos de linfócitos T CD4+ com expressão do co-ativador CD28, assim como os linfócitos T CD4+ de memória CD45RO+ no D+30 após o transplante, estiveram associados a um aumento do risco da reativação do CMV ao longo dos acompanhamentos.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, ABUL. K.; LICHTMAN, ANDREW. H.; PILLAI, SHIV. **O complexo principal de histocompatibilidade**. In. *Imunologia celular e molecular*. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, b. cap. 6, p. 117-123. 2015.

APPERLEY J, CARRERAS E, et al. **Haematopoietic Stem Cell Transplantation**. Paris, France. *European school of Hematology*. v. 27, n 4, p. 312, 2008.

AVERSA F, TERENCE A, TABILIO A, FALZETTI F, CAROTTI A, BALLANTI S, et al. **Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse**. *J Clin Oncol*. v. 23, n. 15, p. 3447-54, 2005.

AVERSA F. **Setting the standard in T-cell-depleted haploidentical transplantation and beyond**. *Best Pract Res Clin Haematol*. V. 9,n. 7, 2011.

BAEK HJ, KOOK H, HAN DK, HWANG TJ. **Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children with Leukemia: A single Institution Experience with Respect to Donor**. *J Korean Med Sci*. V. 26 n. 12, 2011.

BACIGALUPO A, LAMPARELLI T, BRUZZI P, et al. **Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO)**. *Blood*. v. 98, p. 2942-7, 2001.

BAGGIO L, LAUREANO ÁM, SILLA LMDR, LEE DA. **Natural killer cell adoptive immunotherapy: Coming of age**. *Clin Immunol. Apr*. v.117, p. 177:3-11, 2017.

BALDOMERO, Helen. et al. **Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Global Perspective**, *The Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 303, n. 16, p. 1617-1624, mai. 2010.

BORAE G. PARKA B, CHAN-JEOUNG PARKA, SEONGSOO JANGA, HYUN-SOOK CHIA, DAE-YOUNG KIMC, JUNG-HEE LEEC, JE-HWAN LEEC, KYOO-HYUNG.

Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation: comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients; Leukemia Research. v. 39, p. 1334–1341, 2015.

BERGER M, BIASIN E, SAGLIO F, FAGIOLI F. **Innovative approaches to treat steroid-resistant or steroid refractory GVHD.** Bone Marrow Transplant. v. 42, p. 101–5, 2008.

BROWN, J.M; CHAN-JEOUNG PARK et al. **The influence of the conditions of hematopoietic cell transplatation on infectious complications. Curr Opin Infect Dis, Aug 2005. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation:** comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients. Leukemia Research. v. 39, p. 1334–1341. 2015.

BUCHBINDER, S.; ELMAAGACLI, A.H.; SCHAEFER, U. W.; ROGGENDORF, M. **Human Herpesvírus 6 is a Important Pathogen in Infectious Lung Disease After Allogenic Bone Marrow Transplatation.** Bone Marrow Transplant. V. 26, p. 639-644, 2000.

BURTON CE, SESTER M, ROBINSON JL, EURICH DT, URSCHEL S, PREIKSAITIS JK. **CMV-specific T-cells and CD27-CD28-CD4+ T-cells for assignment of cytomegalovirus (CMV) status in adults awaiting organ transplant.** J Clin Virol. n. 115, p. 37- 42, Mar 25, 2019.

CANGUSSU, LUIZ OTÁVIO FREIRE. **Associação entre os antígenos leucocitários humanos de classe II e a hepatite C crônica.** 2008. 83f. Tese (Doutorado em Gastroenterologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CAHN JY,KLEIN JP,LEE SJ, *et al.* **Prospective evaluation of 2 acute graftversus-host disease (GVHD) grading systems:** a joint Societe Française de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC),Dana Farber Cancer Institute (DFCI) and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. Blood. v. 106, p. 1495, 2005.

CASTAGNOLA, E. *et al.* **Cytomegalovirus Infection After Bone Marrow Transplantation in Children.** Human Immunology. v. 65, p. 416-422, 2004.

COPELAN EA. **Hematopoietic Stem-Cell Transplantation.** N Engl J Med. v. 27, n. 354, p. 1813-1826, Apr 2006.

CORNELISSEN JJ: **Immune reconstitution after allogeneic transplantation: clinical and experimental findings.** Hematol J. v. 3, n. 5, p. 101-105 5, 2002.

CHOI B-S, PARK Y-K, LEE J-S: **The CD28/HLA-DR expressions on CD4+T but not CD8+T cells are significant predictors for progression to AIDS.** Clin Exp Immunol. v. 127, p. 120-137, 2002.

DELANEY, C; GUTMAN, J.A.; APPELBAUM, F.R. **Cord blood transplantation for haematological malignancies: conditioning regimens, double cord transplant and infectious complications.** British Journal of Haematology. v. 147, p. 207-216, 2009.

DERHOVANESSIAN, A.B. MAIER, K. HÄHNEL, *et al.* **Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans** Gen Virol, v. 92, n. 12, p. 2746-2756, 2011.

SMALL TN, AVIGAN D, COSTA, DUPONT B *et al.* **Immune reconstitution. — Infecções por Citomegalovirus (CMV): Epidemiologia e tratamento.** Rev Bras de Clín Ter, v. 25 n. 1, p. 18-28,1999.

SYLWESTER, B.L. MITCHELL, J.B. EDGAR, *et al.* **Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects** J Exp Med, n. 202, p. 673-685, 2005.

FALLEN, P. R. *et al.* **Identification of non-naïve CD4+CD45RA+ T cell subsets in adult allogeneic haematopoietic cell transplant recipients.** Bone Marrow Transplantation. v. 32, p. 609-616, 2003.

FERRERA JLM, LEVINE JE, REDDY P, HOLLER E. **Graft-versus-host disease. Lancet.** v. 373, p.1550-1561, 2009.

FARNAULT L, GERTNER-DARDENNE J, GONDOIS-REY F, MICHEL G, CHAMBOST H, HIRSCH I, ET AL. **Clinical evidence implicating gamma-delta T cells in EBV control** following cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* v. 48, n. 11, 1478–9; 2013.

FLETCHER, M. VUKMANOVIC-STEJIC, P.J. DUNNE, *et al.* **Cytomegalovirus-specific CD4+ t cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion** *J. Immunol.*, v. 175, p. 8218-8225, 2005.

GEDDES, M. & STOREK, J. **Immune reconstitution following hematopoietic stemcell transplantation.** *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* v. 20, p. 329–348, 2007.

GIEBEL, SEBASTIAN; *ET AL.* **Association of Human Development Index with rates and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute leukemia.** *Blood Journal, Washington,* v.116, n. 1, p. 122-128, abr 2010.

GREEN ML, LEISENRING WM, XIE H, WALTER RB, MIELCAREK M, SADMAIER BM. **CMV reactivation after allogeneic HTC and relapse risk: evidence for early protection in acute Myeloid Leukemia.** *Blood.* v. 122, n. 7, p. 275-82, 2013.

HAZENBERG, M. D. *et al.* **T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events.** *Blood,* v. 99, p. 3449-3453, 2002.

HEBART, H. & EINSELE, H. **Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation.** *Human Immunology.* v. 65, p. 432-436, 2004.

HISLOP, A. **Early virological and immunological events in Epstein–Barr virus infection.** *Current Opinion in Virology .* v. 25, p. 75-79, 2005.

HENSEL N, BURT RK, DEEG HJ, LOTHIAN ST, SANTOS GW. **Mhc and bone marrow transplantation in: Bone marrow transplantation.** Austin: Landes. v. 45 p. 135-48, 1998.

HIBBERD, P.L.; & SNYDMAN, D.R.— **Cytomegalovirus infection in organ transplant recipients.** *Infect Dis Clin of Nor Am*, v. 9, n. 4, p. 863-877, 1995.

HONFFBRAND AV, PETTIT JE, *et al.* **Essential HEMATOLOGY.** Oxford Malden, MA: Blackwell Science. 2001.

HOLLINGSWORTH CL, FRUSH DP, KURTZBURG J, PRASAD VK: **Pediatric hematopoietic stem cell transplantation and the role of imaging.** *Radiology*, v. 248, p. 348–365, 2008.

HUANG Y, YING Z, QUAN W, XIANG W, XIE D, WENG Y, LI X, LI J, ZHANG X. **The clinical significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio and monocyte-to-lymphocyte ratio in Guillain-Barré syndrome.** *Int J Neurosci*. v. 128, n. 8, p. 729-735, Aug 2018.

INAMOTO Y, FLOWERS ME, APPELBAUM FR, *et al.* **A retrospective comparison of tacrolimus versus cyclosporine with methotrexate for immunosuppression after allogeneic hematopoietic cell transplantation with mobilized blood cells.** *Biol Blood Marrow Transplant*. n. 17, p. 1088-92, 2011

INSTITUTO NACIONAL DE CARCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Topicos em Transplante de Células Tronco Hematopoéticas. Doença do enxerto contra Hopedeiro.** Cap 2, p. 45-53, dez 2012.

JACKSON, G.X. SEDIKIDES, G. OKECHA, E.L. POOLE, J.H. SINCLAIR, M.R. WILL S. **Latent cytomegalovirus (CMV) infection does not detrimentally alter T cell responses in the healthy old, but increased latent CMV carriage is related to expanded CMV-specific T cells**
Front Immunol, v. 8, p. 733, 2017.

JANEWAY, C. A. *et al.* **Auto-Imunidade e Transplante.** In: **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença.** v 5. ed: Artmed,. cap. 13, p. 549- 558, 2002.

KOLINS JA, ZBYLUT C, MCCOLLON S, AQUINO VM, **Hematopoietic Stem Cell Transplantation in childrens.** *Criat care nurs Nam.* v. 23, p. 349-376, 2011.

KONING C, LANGENHORST J, VAN KESTEREN C, LINDEMANS CA, HUITEMA ADR, NIERK. **Innate Immune Recovery Predicts CD4⁺ T Cell Reconstitution after Hematopoietic Cell Transplantation.** *Biol Blood Marrow Transplant.* v. 10, n. 83, p. 1083-3, Oct 2018.

LIA MINCULESCU, HANNE VIBEKE MARQUART, LONE SMIDSTRUP FRIIS, SOEREN LYKKE PETERSEN , IDA SCHIODT , LARS PETER RYDER , NIELS SMEDEGAARD ANDERSEN , HENRIK SENGELOEV. **Early Natural Killer Cell Reconstitution Predicts Overall Survival in T Cell–Replete Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** *Biol Blood Marrow Transplant.* v. 22 p. 2187–2193, 2016.

LOCATELLI F, BAUQUET A, PALUMBO G, MORETTA F, BERTAINA A. **Negative depletion of alpha/beta⁺ T cells and of CD19⁺ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation.** *Immunology letters.* v. 155, p. 21-23, 2013.

LU A, LI H, ZHENG Y, TANG M, LI J, WU H, ZHONG W, GAO J4, OU N, CAI Y. **Prognostic Significance of Neutrophil to Lymphocyte Ratio, Lymphocyte to Monocyte Ratio, and Platelet to Lymphocyte Ratio in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma.** *Biomed Res Int.* v. 30 p. 47-802, 2017.

TAN D, FU Y, TONG W, LI F. **Prognostic significance of lymphocyte to monocyte ratio in colorectal cancer: A meta-analysis.** *Int J SurgJul.* v. 55, p. 128-138, 2018.

TAKATSUKA, H.; WAKAE, T.; MORI, A.; OKADA, M.; FUJIMORI, Y.; TAKEMOTO, Y.; OKAMOTO, T.; KAMAMARU, A.; KAKISHITA, E. – **Endothelial Damage Caused**

by Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 6. Bone Marrow Transplant. v. 31, p. 475-479, 2003.

TIERCY JM, BUJAN-LOSE M, CHAPUIS B, *et al.* **Bone marrow transplantation with unrelated donors: what is the probability of identifying an HLA-A/B/Cw/DRB1/B3/B5/DQB1-matched donor** Bone Marrow Transplant. v. 22 p. 2187, 2000.

TOUBERT A, Glauzy S, Douay C, Clave E. **Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again.** Tissue Antigens v. 79, n. 2, p. 83–9, 2012.

CHIBAS *et al.* **Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity.** J Immunol v. 175, n. 2, p. 1320-28, 2005.

TORRES, MARGARETH AFONSO. **Human leukocyte antigens (HLA): informações básicas para um hematologista.** In: HAMERSCHLAK, Nelson (Org.). Manual de hematologia, Barueri: Manole. cap. 55, p. 425- 430, 2010.

THEURICH S, FISCHMANN H, SHIMABUKURO-VORNHAGEN A, *et al.* **Polyclonal antithymocyte globulins for the prophylaxis of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell or bone marrow transplantation in adults.** The Cochrane database of systematic reviews. V. 9:CD009159, 2012.

LA ROSA, J. LONGMATE, J. MARTINEZ, *et al.* **MVA vaccine encoding CMV antigens safely induces durable expansion of CMV-specific T cells in healthy adults** Blood, n. 129, p. 114-125, 2017.

LIA MINCULESCU, HANNE VIBEKE MARQUART, LONE SMIDSTRUPS FRIIS, SOEREN LYKKE PETERSEN, IDA SCHIØDT, LARS PETER RYDER, NIELS SMEDEGAARD ANDERSEN, HENRIK SENGELOEV, **“Early NK Cell Reconstitution Predicts Overall Survival in T-Cell Replete Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation”**, Biology of Blood and Marrow Transplantation. v. 22, p. 2187-2193, 2016.

LI J, CHENG Y, JI Z. **Prognostic value of pretreatment lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with urologic tumors: A PRISMA-compliant meta-analysis.** *Medicine (Baltimore)*. v. 98, n. 2, p.14091, 2019.

LUSKIN, M. R., HEIL, D. S., TAN, K. S., *et al.* **The impact of EBV status on characteristics and outcomes of posttransplantation lymphoproliferative disorder.** *American Journal of Transplantation*. v. 15, p. 2665–2673, 2015.

MACHADO, L. N.; CAMANDONI, V. O.; LEAL, K. P. H.; MOSCATELLO, E. L. M. **Transplante de medula óssea, abordagem multidisciplinar.** São Paulo: Editora Lemar, 2009.

MARTIN PJ, PAVLETIC SZ: **Biology and management of chronic graft-versus-host disease.** *Cancer Treat Res*. v. 144, p. 277-298, 2009.

MAYA TC, AZULAY, D.R, LUPI O.; SILVA AS, PEREIRA Jr., A.C. **Infecção pelo Citomegalovírus.** In: Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento, 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda. Cap. 8, p. 135-156, 2000.

MEIJER E, BOLAND GJ, VERDONCK LF. **Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants.** *Clin Microbiol Rev* 16, p. 647–57, 2003.

MUSTAFA MM. **Cytomegalovirus Infection and Disease in the Immunocompromised Host.** *The Pediatric Infectious Diseases Journal*, v. 3, p. 249-259, 1994.

NASH RA, FOERSTER J. LUKENS JN, RODGERS GM, PARASKEVAS F, GLANDER B, WINTROBE S. **Hematopoietic Stem cell Transplant** in greer JP *Clinical Hematology*. Printed in USA: ed. 11 Lippincott Williams & Wilkins, p. 883-909, 2004.

OLINGY CE, DINH HQ, HEDRICK CC. **Monocyte heterogeneity and functions in cancer.** *J Leukoc Biol*. v. 10, p.1002, Feb 18, 2019.

O'SHEA JJ, PAUL WE. **Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells**. Science. v. 327, p. 1098–1102, 2010.

PAN YC, JIA ZF, CAO DH, WU YH, JIANG J, WEN SM, ZHAO D, ZHANG SL, CAO XY. **Preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) could independently predict overall survival of resectable gastric cancer patients**. Medicine (Baltimore). v. 97, n. 52, p. 13896, 2018.

PEI X-Y, ZHAO X-Y, XU L-P, WANG Y, ZHANG X-H, CHANG Y-J AND HUANG X-J. **Immune reconstitution in patients with acquired severe aplastic anemia after haploidentical stem cell transplantation**. v. 39, p. 1334–1341, 2015.

POWLES RL, MORGENSTERN GR, KAY HE, MCELWAINS TJ, CLINK HM, DADY PJ, e al. **Mismatched family donors for bone-marrow transplantation as treatment for acute leukaemia**. Lancet. v. 1 n 8325, p. 612-5, 1983.

POLCHI P, LUCARELLI G, GALIMBERTI M, GIARDINI C, BARONCIANI D, ANGELUCCI E, ET AL. **Haploidentical bone marrow transplantation from mother to child with advanced leukemia**. Bone Marrow Transplant. v. 16, n. 4, p. 529-35. 1995.

RUUTU T, VAN BIEZEN A, HERTENSTEIN B, *et al*. **Prophylaxis and treatment of GVHD after allogeneic haematopoietic SCT: a survey of centre strategies by the European Group for Blood and Marrow Transplantation**. Bone Marrow Transplant. v. 47, p.1459-64, 2014.

SALLUSTO F. **Heterogeneity of Human CD4 +T Cells Against Microbes**. Annu Rev Immunol. v. 34, p. 317–334, 2016.

SILLA, L. **Immunotherapy with natural killer cells: a possible approach for the treatment of Acute**. Myeloid Leukemia also in Brazil. Rev Assoc Med Bras (1992). v. 1, n. 62, p.23-24; Oct 2016.

SIMONETTA F, ALVAREZ M, NEGRIN RS. **Natural Killer Cells in Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation.** Front Immunol. v. 8, p. 465, Apr 25, 2017.

SEGGEWIS R, EINSELE H. **Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update.** Blood v. 115, n. 19, p. 3861, 2010.

SCHREIBER SL, CRABTREE GR. **The mechanism of action of cyclosporin A and FK506.** Immunology today. v. 13, p.136-42, 1992

SHI C, PAMER EG. **Monocyte recruitment during infection and inflammation.** Nat Rev Immunol. v. 11, p. 762–774, 2011.

STOREK, J. *et al.* **Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts.** American Journal Hematology. v. 54, p. 131-8.1997.

STORB R, DEEG HJ, WHITEHEAD J, *et al.* **Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia.** N Engl J Méd. n. 314, p. 729-35, 1986.

SYMONS HJ, FUCHS EJ. **Hematopoietic SCT from partially HLA mismatched (HLA-haploidentical) related donors.** Bone Marrow Transplant. v. 42, p. 6 365-77, 2008.

RAZONABLE, R.R., FANNING, C., BROWN, R.A., ESPY, M.J., RIVERO, A., WILSON J, *et al.* **Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts.** J Infect Dis. v. 185, p.110-113, 2002.

REDDY, N., Rezvani, K., Barrett, A., & Savani, B. **Strategies to prevent EBV reactivation and posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after allogeneic stem cell transplantation in high-risk patients.** Biology of Blood and Marrow Transplantation. v. 17, n. 5, p. 591-597, 2010.

ROSS PERKO, GUOLIAN KANG, ANUSHA SUNKARA, WING LEUNG, PAUL G. THOMAS, AND MARI H. DALLAS. **Gamma Delta T Cell Reconstitution is Associated with Fewer Infections and Improved Event Free Survival following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Pediatric Leukemia Gamma Delta T Cells after HSCT.** Biol Blood Marrow Transplant.; v. 21, n. 1, p.: 130–136. Jan 2015.

RUGGERY L et al, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, Stern M, Pende D, Perruccio K, Burchielli E, Topini F, Bianchi E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A: **Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value.** Blood. v. 110, p. 433-440, 2007.

VAN LEEUWEN, E.B. REMMERSWAAL, M.H. HEEMSKERK, I.J. TEN BERGE, R.A. **van Lier Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4+ T-cell clones during primary human cytomegalovirus infection** Blood. v. 108, p. 3121-3127, 2006.

VELLA LA, HERATI RS, WHERRY EJ. **CD4+ T Cell Differentiation in Chronic Viral Infections: The Perspective.** Trends Mol Med. v. 23, n. 12, p. 1072-1087, 2017.

VIGNALI DA, COLLISON LW, WORKMAN CJ. **How regulatory T cells work.** Nat Rev Immunol. v. 8, n. 7, p. 523-32, Jul 2008.

VINCENT K, ROY DC, PERREAULT C: **Next-generation leukemia immunotherapy.** Blood. v. 118, p. 2951-2959, 2011.

VOGELSANG GB. **Advances in the treatment of graft-versus-host disease.** Leukemia. v. 14, p. 509–510, 2000.

ZEISER R, BLAZAR BR. **Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets.** N Engl J Med. v. 377, n. 26, p. 2565-2579, 2017.

WANG LD, Wagers AJ. **Dynamic niches in the origination and differentiation of hematopoietic stem cells.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* v.12, n. 10, p. 643-55, 2011.

YU, J., FREUD, A. G. & CALIGIURI, M. A. **Location and cellular stages of natural killer cell development.** *Trends Immunol.* n. 34, p. 573–82, 2013.

ZHU J, YAMANE H, PAUL WE. **Differentiation of effector CD4 T cell populations.** *Annu Rev Immunol.* v. 28, p. 445-89, 2010.