

MÍRIAM PERLINGEIRO BELTRAME

**RECUPERAÇÃO IMUNE EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI APÓS
TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ALOGÊNICO**

CURITIBA

2013

MÍRIAM PERLINGEIRO BELTRAME

**RECUPERAÇÃO IMUNE EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI APÓS
TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ALOGÊNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Clínica Médica, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini

Coorientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

CURITIBA

2013

Beltrame, Míriam Perlingeiro

Recuperação imune em pacientes com Anemia de Fanconi após transplante de Medula Óssea Alogênico / Míriam Perlingeiro Beltrame. – Curitiba: UFPR / Curso de Doutorado em Ciências da Saúde, 2013.

xvi, 110 f.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini

Coorientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Tese (doutorado) – UFPR / Curso de Doutorado em Ciências da Saúde, 2013.

Referências bibliográficas: f. 60-69

1. Anemia de Fanconi. 2. Transplante de medula óssea. 3. Transplante de célula-tronco hemotopoética. 4. Sistema imunológico - Tese. I. Pasquini, Ricardo. II. Universidade Federal do Paraná, Curso de Doutorado em Ciências da Saúde. III. Título.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.



Ata da Reunião Extraordinária do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna da UFPR realizada nos termos da Resolução da UFPR -Resolução nº 65/09 - CEPE..

Ao primeiro dia do mês de novembro do ano de dois mil e treze, às oito horas e trinta minutos, no Anfiteatro do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Paraná, em ato público teve início a avaliação da Tese de conclusão do Curso de Doutorado do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná**, da aluna **Miriam Perlingeiro Beltrame**, intitulada: **“RECUPERAÇÃO IMUNE EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI APÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ALOGÊNICO”**. A sessão foi aberta pelo Professor Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive, coordenador do programa, que procedeu à apresentação dos componentes da banca examinadora e da aluna concluinte, que delineou a condução dos trabalhos. A Banca Examinadora foi constituída pelos Professores: **Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla (UFRGS)**, **Dra. Mihoko Yamamoto (UFSP-EPM)**, **Dra. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze (UNICAMP)**, **Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho (UFPR)** e **Dr. Ricardo Pasquini - Orientador**. A candidata dispôs de trinta minutos para apresentar o trabalho, seguindo-se a arguição pela Banca Examinadora, em que cada membro dispôs de trinta minutos para argüir, com igual tempo concedido a aluna para defesa. Concluída a arguição, retirou-se a Banca Examinadora para consignação dos conceitos, com lavratura do Parecer Conjunto que considerou o trabalho **aprovado**, sem modificações substanciais na forma e conteúdo, e que foi indicado para publicação nos meios de divulgação científica depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições. E para que tudo constasse, na forma do que se legalmente institui foi a presente ata lavrada por mim Lúcia Lemiszka, secretaria e vai assinada pelos componentes da Banca Examinadora para posterior homologação do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná.

Prof. Dra. **Lúcia Mariano da Rocha Silla**

Prof. Dra. **Mihoko Yamamoto**

Professor Dr. **Ricardo Pasquini**

Professor Dr. **Nelson A. do Rosário Filho**

Prof. Dra. **Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze**

Ao meu esposo, Paulo,
Aos meus filhos, Mônica, Marcelo e Gustavo,
Aos meus pais *in memoriam*,
Gilberto e Olga.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoou e capacita para tudo àquilo que Ele me destina. A Deus pela minha existência, pelo amor incondicional, pela saúde, força e capacidade que me dá todos os dias.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini 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 TMO.

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas pela coorientação, oportunidade, atenção e disponibilização do seu laboratório do Hemocentro de Ribeirão Preto e sua aluna Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, na época doutoranda na área de imunologia dos transplantes.

Ao Prof. Dr. Alberto Orfao pelo valioso auxílio na construção, correção, atenção e disponibilização do seu tempo na elaboração dos artigos gerados por esta tese.

À Dra. Rita Perlingeiro minha querida irmã, pelo carinho e pela análise crítica do artigo gerado por este trabalho.

À Profa. Dra. Mariester Malvezzi pela amizade, carinho e paciência na correção deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunofenotipagem, Maria Tadeu Lemes da Rocha, Edna Martins, Yara Schluga, Eliana Lima, Ana Paula de Azambuja, Noeli Terezinha da Silva, Julie Lilian Pimentel Justus e Elisa Eleonora Greco Novello, pelo companheirismo, compreensão nos dias difíceis e agradáveis momentos de convivência.

À Luana Wunsche de Almeida, aluna de Biologia da UFPR, bolsista, pela colaboração na coleta de dados dos prontuários e elaboração das planilhas dos dados obtidos, indispensáveis a este estudo, sempre atenciosa e dedicada.

Ao Programa de Pós-graduação de Medicina Interna/Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelos professores e pela qualidade de formação que é oferecida. Agradeço em especial à Lúcia e Valéria, que sempre me ajudaram com muita atenção e eficiência em todos os momentos em que precisei.

À equipe de todos os turnos do Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas – UFPR, pela realização do hemograma e principalmente, pelo apoio e carinho nesses últimos anos.

Ao Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas – UFPR, pelos dados de HLA e Quimerismo, em especial Dra. Noemi Farah e Márcia Quiroga, pela ajuda e atenção.

À equipe médica da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UFPR, em especial à Dra. Carmem Maria Sales Bonfim, pela atenção e presteza no acompanhamento dos pacientes, encaminhamento das amostras e no fornecimento dos dados clínicos.

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

À Maira Santana (suporte técnico-científico da BD Biosciences) pela paciência, atenção e conhecimento na realização das citocinas séricas.

Ao meu querido Paulo, meu amor, minha referência... Agradeço a Deus, sempre, por ter colocado você em minha vida. Obrigada pela compreensão, carinho, apoio e ajuda incondicionais, principalmente nesses últimos tempos.

Aos meus filhos, amores da minha vida. Agradeço a Deus, sempre, por ter sido abençoada em ser mãe. Obrigada pela compreensão, carinho e apoio nas horas ausentes.

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

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos pacientes transplantados,

*Doutores na arte da vida,
que incansáveis, tornam o desejo de luta maior que o próprio medo
que sedentos de vida, assumem por ela todos os riscos,
o risco mesmo de perdê-la.*

*Com vocês, estamos sempre aprendendo
que a luta, nem sempre seguida de vitória,
é o que importa e torna preciosa nossa efêmera existência.*

*Aos que vitoriosos alcançaram o objetivo de viver,
Aos que persistentes continuam lutando,
Aos que perderam a batalha, mas engrandeceram seu espírito
e deixaram em nossa memória a lembrança de sua coragem.*

(Autor desconhecido)

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença hereditária autossômica recessiva, caracterizada pela falha/aplasia de medula óssea (MO). A falha da hematopoese resulta na depleção do reservatório de células estaminais da medula óssea, o que leva à anemia grave, neutropenia e trombocitopenia, e o paciente necessita de intervenções terapêuticas frequentemente, incluindo o transplante de células-tronco hematopoéticas (HSCT), com o objetivo da reconstituição celular normal.

Método. Neste estudo, foi realizado uma análise detalhada da distribuição das subpopulações linfocitárias T, B e NK no sangue periférico, por citometria de fluxo, de 23 pacientes com Anemia de Fanconi, antes e após o transplante de medula óssea (TMO), nos dias D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360. Em paralelo, foram comparados os dados dos pacientes no pré e pós transplante (D+360) com o grupo controle. Além disso, foram comparados os grupos de pacientes que receberam medula óssea doadores relacionados e não relacionados, pré e pós-TMO, nos períodos descritos acima.

Resultados. Após o transplante, foram observadas diferentes cinéticas de recuperação para as distintas subpopulações de linfócitos, quando comparados com os parâmetros de pré-transplante. As células NK foram as primeiras a recuperar, seguidas pelos linfócitos T citotóxicos CD8⁺, linfócitos B e, finalmente os linfócitos T auxiliares CD4⁺. A recuperação inicial foi às custas dos linfócitos T de memória que seriam, portanto, potencialmente derivados do enxerto, enquanto que, os linfócitos T virgens, recém emigrados do timo, de fenótipo CD31⁺CD45RA⁺, CD4⁺ ou CD8⁺, aumentaram somente seis meses após do transplante, na presença de profilaxia imunossupressiva para doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Enquanto que pequenas diferenças foram observadas na recuperação precoce dos linfócitos T citotóxicos CD8⁺ entre os pacientes que receberam TMO aparentado e não aparentado, casos com DECH mostraram diferenças marcantes quando comparados com outros pacientes.

Conclusões. Os resultados enfatizam a importância da quantificação das subpopulações linfocitárias no sangue periférico, para melhorar a monitoração e seguimento de pacientes com Anemia de Fanconi que receberam transplante de medula óssea.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi. Transplante de medula óssea. Transplante de célula-tronco hematopoética. Sistema imunológico.

ABSTRACT

Background. Fanconi anemia is an autosomal recessive disorder characterized by bone marrow (BM) failure/aplasia. Failure of hematopoiesis results in depletion of the BM stem cell reservoir, which leads to severe anemia, neutropenia and thrombocytopenia, frequently requiring therapeutic interventions including hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Successful BMT requires reconstitution of normal immunity.

Methods. In the present study, a detailed analysis of the distribution of peripheral blood subsets of T, B and NK lymphocytes in 23 patients with Fanconi anemia before and after BM transplantation (at days D+30, D+60 and D+100, D+180 D+270 and D+360). The data collected from the patients, in pre and post-transplantation (day +360), were also compared with the control group. Moreover, we compared the patients groups who received related and unrelated bone marrow donors, pre and post BMT, in the periods described above.

Results. After transplantation, we found different kinetics of recovery for the distinct major lymphocyte subsets. Nk cells were the first to recover, followed by cytotoxic CD8+ T-cells and B-cells, and finally also the CD4+ T-helper cells. Early recovery was at the expenses of memory cells which would therefore be potentially derived from the graft whereas, recent thymic emigrant (CD31+ CD45RA+) and naïve CD4+ or CD8+ T-cells, rose only 6 months after HSCT, in the presence of immunosuppressive graft-vs-host disease (GVHD) prophylactic agents. While only slight differences were observed in the early recovery of cytotoxic CD8+ T-cells among cases receiving a graft from related vs. unrelated donors, cases suffering from GVHD displayed more marked differences vs other patients.

Conclusions. Overall, our results support the utility of post-transplant quantification of peripheral blood lymphoid subsets, for improved monitoring and follow-up of Fanconi anemia patients undergoing BMT.

Key words: Bone marrow. Fanconi anemia. Immune system. Transplantation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estratégia de análise bivariada das subpopulações linfocitárias T	15
Figura 2 – Estratégia de análise bivariada das subpopulações linfocitárias B	16
Figura 3 – Reconstituição de leucócitos totais, linfócitos, monócitos e neutrófilos em pacientes com Anemia de Fanconi após o TMO.....	21
Figura 4 – Reconstituição de linfócitos T, pré e pós TMO	23
Figura 5 – Reconstituição de linfócitos B, pré e pós TMO.....	26
Figura 6 – Reconstituição de linfócitos NK, pré e pós TMO.....	27
Figura 7 – Reconstituição dos linfócitos T CD4 virgens, memória, memória efetora e efetores diferenciados, pré e pós TMO.....	32
Figura 8 – Reconstituição de linfócitos CD8 virgens, memória, memória efetora e efetores diferenciados, pré e pós TMO.....	33
Figura 9 – Reconstituição dos linfócitos T senescentes/replicativos, CD57 ⁺ CD28 ⁻ CD4 ⁺ ou CD8 ⁺ , pré e pós TMO	36
Figura 10 – Reconstituição dos linfócitos T recém-imigrados do timo, CD45RA ⁺ CD31 ⁺ CD4 ⁺ ou CD8 ⁺ , pré e pós TMO	38
Figura 11 – Reconstituição de linfócitos T reguladores, CD25 ^{fo} CD127 ^{fr} CD4 ⁺ , pré e pós TMO	42
Figura 12 – Expressão dos marcadores	49
Figura 13 – Valores absolutos dos linfócitos T CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ e CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 no pré- e pós-tx nos pacientes que receberam medula óssea aparentada e não aparentada, nos dias D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos pacientes	11
Tabela 2 – Anticorpos monoclonais conjugados usados para análise por citometria de fluxo dos subgrupos de linfócitos em sangue periférico e painéis correspondentes	17
Tabela 3 – Número de leucócitos	20
Tabela 4 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto de linfócitos, monócitos, eosnófilos e neutrófilos (Pré-TMO)	22
Tabela 5 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto de linfócitos, monócitos, eosnófilos e neutrófilos (Pós-TMO)	22
Tabela 6 – Curva dos linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ (TCR $\gamma\delta$ ⁺)	24
Tabela 7 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto de linfócitos T (Pré-TMO)	24
Tabela 8 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto de linfócitos T (Pós-TMO)	25
Tabela 9 – Linfócitos T citotóxicos CD3 ⁺ CD8 ⁺	25
Tabela 10 – Linfócitos NK CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	27
Tabela 11 – Linfócitos NKT CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	28
Tabela 12 – Linfócitos T virgens CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD45RO ⁻	29
Tabela 13 – Linfócitos T memória central CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD45RO ⁺	29
Tabela 14 – Linfócitos T memória efetora CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD45RO ⁺	29
Tabela 15 – Linfócitos T efetores diferenciados CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD45RO ⁻	30
Tabela 16 – Linfócitos T virgens CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD45RO ⁻	30
Tabela 17 – Linfócitos T memória central CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD45RO ⁺	30
Tabela 18 – Linfócitos T memória efetora CD8 ⁺ CD27 ⁻ CD45RO ⁺	31
Tabela 19 – Linfócitos T efetores diferenciados CD8 ⁺ CD27 ⁻ CD45RO ⁻	31
Tabela 20 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto de linfócitos T naive CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD45RO ⁻ (Pré-TMO)	33
Tabela 21 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto de linfócitos T naive CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD45RO ⁻ (Pós-TMO)	34
Tabela 22 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto de linfócitos T naive CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD45RO ⁻ (Pré-TMO)	34
Tabela 23 – Linfócitos T senescentes/replicativas CD4 ⁺ CD57 ⁺ CD28 ⁻	35
Tabela 24 – Linfócitos T Senescentes/replicativas CD8 ⁺ CD57 ⁺ CD28 ⁻	35
Tabela 25 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto de linfócitos T naive CD8 ⁺ CD57 ⁺ CD28 ⁻ (Pré-TMO)	36

Tabela 26 – Linfócitos T virgens recém-imigrados do timo CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺	37
Tabela 27 – Linfócitos T virgens recém-imigrados do timo CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺	37
Tabela 28 – Linfócitos T em apoptose celular CD95 ⁺ CD3 ⁺	38
Tabela 29 – Linfócitos B em apoptose celular CD95 ⁺ CD19 ⁺	39
Tabela 30 – Linfócitos T em apoptose celular CD178 ⁺ CD3 ⁺	39
Tabela 31 – Linfócitos B em apoptose celular CD178 ⁺ CD19 ⁺	40
Tabela 32 – Linfócitos B em ativação celular CD69 ⁺ CD3 ⁺	40
Tabela 33 – Linfócitos B em ativação celular CD69 ⁺ CD19 ⁺	41
Tabela 34 – Linfócitos T reguladores CD25 ^{fo} CD127 ^{fr} FOXP3 ⁺ CD4 ⁺	41
Tabela 35 – Linfócitos T reguladores CD25 ^{fo} GITR ⁺ FOXP3 ⁺ CD4 ⁺	42
Tabela 36 – Dados referentes ao grupo controle	43
Tabela 37 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto das populações linfocitárias estudadas (Pré-TMO)	44
Tabela 38 – Análise comparativa do grupo controle vs pacientes quanto ao número absoluto das populações linfocitárias estudadas (Pós-TMO)	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
AF	Anemia de Fanconi
APC	do inglês “allophycocyanin” ou Fluorocromo Alofococianina
ATG	do inglês “anti-thymocyte-globulin” ou globulina anti-linfocitária
CAA	Célula Apresentadora de Antígeno
CD	do inglês "cluster of differentiation" ou grupamento de diferenciação
CTH	Célula-Tronco Hematopoética
CTL-4	“Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4” ou Antígeno 4 Linfócito T Citotóxico
DECH	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” ou Ácido Desoxirribonucleico.
EDTA	sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético
FACS	do inglês "Fluorescence-Activated Cell Sorter
FITC	do inglês "Fluorescein Isothiocyanate" ou isotiocianato de fluoresceína
FOXP3	“Transcription Factor Forkhead Box P3”
GITR	“Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor Family – Related”
HLA	do inglês “Human Leukocyte Antigens” ou antígenos leucocitários humanos
IFN- γ	do inglês “gamma interferon” ou interferon gama
IL	interleucina
MHC	do inglês “Major Histocompatibility Complex” ou Complexo Principal de Histocompatibilidade
PBS	do inglês “Phosphate-buffered solution” ou tampão salina fosfato
PE	do inglês “Phycoerythrin” ou Fluorocromo Ficoeritrina
PERCP	do inglês “Peridinin-chlorophyll Protein Complex” ou Fluorocromo Complexo Proteína Peridinina Clorofila
PCR	do inglês "Polymerase Chain Reaction" ou reação em cadeia da polimerase
PE-Cy5	do inglês “Phycoerythrin cyanine 5 tandem ” ou Ficoeritrina Cianina 5
Pré-TMO	Pré transplante de medula óssea
Pré-tx	Pré-transplante
Pós-TMO	Pós transplante de medula óssea
Pós-tx	Pós-transplante
TCR	do inglês “T cell receptor”, ou receptor de célula T
TA	Temperatura ambiente

TCTH	Transplante de Célula Tronco Hematopoética
TGF β	do inglês “Transforming growth factor beta” ou Fator β de Transformação do Crescimento
Th	do inglês T “helper” ou células T auxiliaadoras
TMO	Transplante de Medula Óssea
TNF- α	do inglês “Tumor Necrosis Factor alpha” ou Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg	do inglês “Regulatory T Cell” ou Célula T Reguladora
Tx	transplant

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ANEMIA DE FANCONI.....	1
1.2 LINFÓCITOS T EFETORES	4
1.3 LINFÓCITOS T REGULADORES.....	4
1.4 LINFÓCITOS T RECÉM-EMIGRADOS DO TIMO	6
1.5 DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO	6
1.5.1 DECH Aguda.....	7
1.5.2 DECH Crônica.....	7
1.5.3 HIPÓTESE.....	8
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2.3 HIPÓTESE.....	9
3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 CASUÍSTICA	10
3.1.1 Pacientes	10
3.1.2 Amostras	11
3.1.3 Infusão das Células-Tronco Hematopoéticas.....	12
3.1.4 Seguimento do Paciente Após o Transplante.....	12
3.1.5 Controles.....	12
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.2.1 Análise Multiparamétrica por Citometria de Fluxo das Populações Linfocitárias.....	13
3.3 AVALIAÇÃO DA TIPAGEM HLA E DO QUIMERISMO	18
3.4 MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	18
4 RESULTADOS.....	19
4.1 AVALIAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA APÓS O TMO.....	19
4.1.1 Leucócitos Após Alo-TMO.....	19
4.1.2 Linfócitos T Após Alo-TMO	22
4.1.3 Linfócitos B Após Alo-TMO	26
4.1.4 Linfócitos NK Após Alo-TMO.....	26
4.1.5 Linfócitos NKT Após Alo-TMO.....	27

4.1.6 Outras Populações de Linfócitos Após Alo-TMO	28
4.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE APOPTOSE CD95 E CD178 NOS LINFÓCITOS T E B	38
4.3 AVALIAÇÃO NO SANGUE PERIFÉRICO DAS POPS. LINFOCITÁRIAS DO GRUPO CONTROLE	43
4.3.1 Celularidade do Grupo de Controle	43
4.3.2 Comparação Entre Controles e Pacientes na Avaliação Pré-TMO	44
4.3.3 Comparação Entre Controles e Pacientes na Avaliação Pós-TMO.....	46
4.4 RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA EM PACIENTES COM AF QUE RECEBERAM MEDULA ÓSSEA DE DOADOR RELACIONADO E NÃO RELACIONADO	51
5 DISCUSSÃO	53
5.1 AVALIAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO IMUNE APÓS O TMO	53
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES.....	70
ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

A proliferação e a maturação das células sanguíneas é um processo especialmente controlado que envolve um número relativamente extenso de fatores de crescimento e de citocinas (KUTLER et al., 2003; GREEN et al., 2009). O nicho da medula óssea (MO), que compreende as células estromais e vasculares, é crítico em proporcionar o microambiente ideal para a hematopoese (SOULIER, 2011). No entanto, mudanças nos níveis de citocinas e/ou do microambiente hematopóético podem levar a alterações na hematopoese, incluindo aplasia de medula óssea (SHUKLA et al., 2012).

1.1 ANEMIA DE FANCONI

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença hereditária caracterizada basicamente pela síndrome de falência medular (SVAHN e DUFOUR, 2011). Estes pacientes apresentam um defeito no reparo do DNA que leva progressivamente ao acúmulo de alterações cromossomiais e genéticas. Além da anemia, os pacientes com AF mostram má formações congênitas, surdez e hiperpigmentação de pele (manchas café com leite), além de outros sintomas (COLIN et al., 2006). É uma doença imprevisível já que alguns pacientes podem desenvolver leucemia e tumores sólidos em algum momento da vida (MEDEIROS et al., 2006). Entre as opções terapêuticas disponíveis o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) é o mais eficaz, uma vez que aumenta a chance de maior sobrevivência dos pacientes (DALLE, EILER e VOLTARELLI, 2008; MYRES et al., 2009; PINTO et al., 2009; MacMILLAN, WAGNER e VOLTARELLI, 2010). Um dos maiores problemas associados ao pós-transplante é o estado transitório de imunodeficiência, com alto grau de morbidade e mortalidade (SCHULTZ et al., 2006). A gravidade e a duração desta fase varia de acordo com a fonte celular utilizada (medula óssea, sangue periférico, sangue de cordão umbilical), desenvolvimento da doença do enxerto-contrá-hospedeiro (DECH) e da atividade tímica residual, entre outras variáveis (ABRAHAMSEN et al. 2005; LOCATELLI et al., 2008).

Na área do transplante alogênico de CTH o uso de fontes alternativas destas células além da medula óssea, como as células-tronco periféricas e o sangue de cordão umbilical, tem

aumentado muito nos últimos anos. Os pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea (TMO) experimentam um período de prolongada imunodeficiência celular e humoral, devido à completa destruição das células linfo-hematopoéticas do receptor e a utilização de drogas imunossupressoras para a profilaxia e tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) (DONALL et al., 1999; CUTLER e ANTIN 2001). Esta imunodeficiência permanece até que as células precursoras contidas no enxerto do doador reconstituam o sistema hematopoético do receptor, destruídos pelo regime de condicionamento pré-transplante. No caso de doenças malignas as células do sistema imunológico do doador restabelecem a celularidade e conferem ação terapêutica contra as células anormais do receptor, mas podem causar a DECH e prolongada deficiência imunológica (MICHEL et al., 2009; BARRETT et al., 2003). No período inicial pós-transplante (pós-tx) a recuperação imunológica depende de dois fatores distintos, o micro-ambiente e as citocinas do receptor, enquanto que a resposta imune tardia depende dos linfócitos T virgens, provenientes da colonização e diferenciação das células precursoras do doador (ARCESE, 2001; REIS e VISENTAINER, 2004; STOCKINGER, 2004). No transplante com célula-tronco periférica o número de linfócitos infundido é maior que no de medula óssea, o que teoricamente poderia melhorar o desempenho da recuperação; porém as infusões com células-tronco periféricas contêm grande número de linfócitos maduros, aproximadamente dez vezes mais que na medula óssea e conseqüentemente, há um aumento na incidência e na gravidade da DECH (MIELCAREK et al., 2003; CLARK et al., 2004). Até o momento, poucos artigos dirigem-se especificamente a detalhes da recuperação imunológica, principalmente, no que se refere a estas células.

O transplante de medula óssea alogênico, objeto deste estudo, é amplamente utilizado em pacientes que têm doador HLA-idêntico, mas somente em torno de 30% dos pacientes possuem irmão compatível (DONALL et al., 1999; ABBAS e LICHTMAN, 2005). A praticidade e segurança em encontrar doadores parcialmente compatíveis na família têm sido investigadas e os resultados têm demonstrado que o HLA compatível é crítico e fator limitante dos transplantes de medula óssea. No caso de 2 ou 3 incompatibilidades, a incidência de DECH pode ocorrer em pelo menos 80% dos casos (revisado por GLUCKMAN e WAGNER, 2008).

Diferenças entre indivíduos que são capazes de reconhecimento imune do próprio e do não próprio, são principalmente devidas ao extremo polimorfismo dos genes do complexo maior de histocompatibilidade (MHC-classe I e II), localizado no cromossomo 6, que codifica as moléculas de superfície-antígeno leucocitário humano (HLA). O polimorfismo é devido aos mais de 250 alelos, detectados sorologicamente e cada alelo pode na realidade conter

múltiplas variantes, por sequenciamento molecular (CAILLAT-ZUCMAN et al., PETERSDORF et al., 2004). Estas moléculas se ligam a peptídeos, derivados de bactérias, vírus, células de tumor, etc, e as apresentam aos linfócitos T, para o subsequente reconhecimento imune. As classes I e II do MHC, que codificam os dois grupos de proteínas estruturalmente distintas e homólogas, isto é, a classe I apresenta peptídeo e é reconhecida pelas células T CD8⁺ (T citotóxico) e a classe II apresenta peptídeo e é reconhecida pelas células T CD4⁺ (T auxiliar). Além disso, os genes MHC são expressos de forma codominante em cada indivíduo, isto é, os alelos são herdados dos pais. O reconhecimento do antígeno apresentado pelas moléculas MHC às células T ocasiona ativação do sistema imunológico, fator importante para o estudo do envolvimento dessas células na resposta imunológica (PETERSDORF et al., 2004; AKPEK, 2013).

A ausência de resposta imunológica é denominada tolerância. A autotolerância é essencial na prevenção de reações contra suas próprias células e tecidos e, ao mesmo tempo, na manutenção de um amplo repertório linfocitário específico para antígenos invasores. Existem dois tipos de tolerância dos linfócitos T em nosso organismo; a central e a periférica. A tolerância central das células T ocorre durante a maturação destas células no timo (ITOH et al. 1999; HANASH e LEVY, 2005). Células T imaturas com alta avidéz são eliminadas e este processo é denominado seleção negativa ou deleção, determinada pela concentração do auto-antígeno e a afinidade dos receptores das células T (TCR) dos timócitos que reconhecem esse auto-antígeno. Caso contrário, a célula se desenvolverá em célula T reguladora, que irá para a periferia. A tolerância periférica das células T é o mecanismo onde as células T maduras, que especificamente reconhecem os antígenos próprios dos tecidos periféricos, se tornam eventualmente incapazes de responder a esses antígenos (anergia, deleção clonal ou supressão das células T). O reconhecimento de uma célula estranha ou alogênica, pelas moléculas HLA do sistema imunológico, é a maior limitação para a sobrevivência de células e órgãos transplantados (SAKAGUSHI, 2004 e 2005).

Embora o progresso científico tenha beneficiado a sobrevida dos pacientes, a rejeição crônica dos enxertos permanece um impedimento para o aumento da sobrevida. São inúmeros os subtipos linfocitários que participam deste extenso, complexo e imprescindível sistema imunológico.

1.2 LINFÓCITOS T EFETORES

A ativação completa da célula T requer o reconhecimento do antígeno (primeiro sinal), assim como o reconhecimento das moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2, células apresentadoras de antígeno (CAA), pelo CD28 (segundo sinal) (ACUTO e CANTREL, 2000; OHATA et al., 2002).

A anergia pode ser induzida quando as células T usam receptores inibidores situados nas células T reguladoras (Tregs), como a CTLA-4 (CD152), nas ligações com B7, durante o processo de reconhecimento do antígeno, ativando sinais inibitórios para a célula T. Não se sabe que fatores determinam o reconhecimento das moléculas de B7 pelos linfócitos T e que resultam na ativação de CD28 (Shuang et al., 2005). Em outras ocasiões, as células T reconhecem as mesmas moléculas B7 com o receptor inibidor CTLA-4 para induzir a tolerância (ACUTO e CANTREL, 2000; LAAR, 2000; JAMESON, 2002 e THIEL et al., 2004).

A eliminação (deleção) repetida de linfócitos T por antígenos resulta na morte das células ativadas por um processo chamado apoptose, que é induzida quando um grande número de células T recentemente ativadas é reativado por antígenos ou por agentes similares aos antígenos, podendo ser mensurados pelos marcadores CD95 (Fas) e CD178 (FasL) (MARCEL e BURAKOFF, 2002).

1.3 LINFÓCITOS T REGULADORES

Algumas respostas imunes são inibidas por células capazes de bloquear a ativação e a função de linfócitos T efetores, estas células inibitórias são as células T reguladoras. São linfócitos T CD4⁺ que apresentam altos níveis de receptor de IL-2 (CD25), mas não outros marcadores de ativação (SAKAGUCHI et al., 1995; HESS, 2006). Presume-se que estas células sejam capazes de reconhecer o antígeno próprio.

Alguns estudos indicam que a ação supressora dessas células está ligada à secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β (ABBAS, 2005). Outros trabalhos sugerem que as células T reguladoras funcionam pela interação direta com as CAAs ou com células T ativadas, e não pela secreção de citocinas (revisado por BLUESTONE et al., 2009).

As células T reguladoras são desenvolvidas primariamente no timo pela seleção positiva dos timócitos, com relativa avidéz por antígenos próprios. São representadas pelas células Treg CD4⁺ naturais, células Th3, células Tr1 e células CD8⁺ (HORI et al., 2003; HILCHEY et al. 2004). Representam de 5%-10% da população de células CD4⁺ Treg naturais. O fenótipo destas células é caracterizado pela expressão de CD4⁺CD25^{fo} e FOXP3⁺ (GODFREY et al.; YAGI et al., 2005, MAGENAU et al., 2010). As células T ativadas também podem expressar CD25 de menor intensidade, mas a expressão de FOXP3 parece determinante nas células T reguladoras. Experimentos têm demonstrado que bloqueios tanto nos receptores de IL-2 (CD25 ou CD122) como nos ligantes de IL-2, resultam em baixo número de células T reguladoras, indicando que a função do CD25 é essencial para seu desenvolvimento. Outros tipos de células T reguladoras podem aparecer na periferia com os tipos Tr1 e Th3 (CHATENOUD e BACH, 2006). As Tr1 são CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ que são induzidas pela IL-10 e tornam-se secretoras desta interleucina e regulam o sistema imunológico. As células progenitoras Th3 são semelhantes às células Tr1 e também são CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻. As células T reguladoras expressam o marcador CTLA-4, que é um regulador negativo na imunidade mediada por células e GITR, que é um membro da superfamília do TNF (fator de necrose tumoral) (HILCHEY et al., 2007).

Um aumento na expressão de CD25, GITR e CD152 nas células T reguladoras, sugere que esta expressão não as define funcionalmente e aumenta a possibilidade de que nem todas as células Tregs expressam estas moléculas (QUEZADA et al., 2005). Até o momento, o marcador definitivo para caracterizar as células T reguladoras é o fator de transcrição FOXP3. Entretanto, a identificação deste marcador requer permeabilização das células, que se traduz na dificuldade para preparação. A fraca expressão do marcador CD127, receptor de IL-7, é “down-modulated” nas células T reguladoras e os estudos têm demonstrado que IL-7R (receptor de interleucina 7) desenvolve importante função na proliferação e maturação das células T (LIU et al., 2006). É expresso também em timócitos, células progenitoras linfóides B e T, monócitos e algumas outras células linfóides e mielóides. A fraca positividade do marcador CD127 associado a expressão intermediária/alta do CD25, além da expressão intra-citoplasmática de FOXP3, que identifica as células T reguladoras (CIEBIADA et al., 2013).

As células CD4⁺ podem se diferenciar em populações de células efetoras que produzem conjuntos diferentes de citocinas e, portanto, desempenham funções distintas. As populações melhor definidas de células T são as células Th1 e Th2; o IFN- γ é a citocina de assinatura das células Th1, e IL-4 e IL-5 são as citocinas que definem as células Th2. As reações imunes crônicas são frequentemente dominadas por uma das duas populações, Th1 ou Th2 (SKERT et al., 2009; ROZMUS et al., 2011). As citocinas produzidas por essas subpopulações de células T

não somente determinam as suas funções efetoras, mas também participam no desenvolvimento e expansão das respectivas subpopulações. O padrão de diferenciação é determinado por estímulos presentes logo no início da resposta imune (WELNIAK et al., TIAN et al., 2007).

1.4 LINFÓCITOS T RECÉM-EMIGRADOS DO TIMO

Até o momento não existem marcadores fenotípicos específicos para identificar as células recém-migradas do timo, demonstradas por KIMMING et al., 2002 e YE e KIRSCHNER et al., 2002 e posteriormente outros grupos como ANNOEK et al., 2003; KOHLER et al., 2009. Estes pesquisadores identificaram que um subgrupo de linfócitos T, $CD4^+CD45RA^+$, que coexpressa o marcador CD31, contém células recém-emigrantes tímicas que apresentam elevados níveis de TREC. As TRECs são fragmentos de DNA excisados na forma de DNA circular, gerados durante o rearranjo gênico do receptor da célula T. As TRECs são estáveis dentro das células, mas não se replicam e são diluídas com a divisão celular, portanto são ótimos marcadores de células T virgens recém-emigradas do timo (DOUEK et al., 2002).

Embora a função do timo diminua na idade adulta, provavelmente devido a sua involução, um importante papel para a reconstituição de células T do timo ainda pode ser mantido, como observado em várias condições clínicas, incluindo pacientes adultos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) após a introdução da terapia antiretroviral altamente ativa (TARAT), bem como o transplante de medula óssea, onde a função tímica demonstrou ser responsável pelo repovoamento celular T (SAITOH et al., 2006). Quanto ao transplante, o timo pode desempenhar um papel importante para a indução de tolerância (HAZENBERG et al., 2002), o que levou a vários estudos deste subtipo celular, devido a sua importância na resposta imune.

1.5 DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO

A DECH é a principal complicação associada ao TMO, tanto a morbidade quanto à mortalidade. A síndrome apresenta características semelhantes a um processo autoimune e sua

patogênese ainda é parcialmente conhecida (FERRARA et al., 2009). Ocorre quando os linfócitos T do doador reconhecem como estranho os antígenos do receptor. Isto ocorre quando o implante apresenta células imunocompetentes e o receptor é incapaz de produzir resposta imune contra o enxerto (FALLEN et al., 2003; SHIMABUKURO-VORNHAGEN et al., 2009).

Embora a DECH seja iniciada por linfócitos T enxertados que reconhecem aloantígenos do hospedeiro, as células efectoras que causam a lesão celular epitelial estão menos bem definidas. Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos alorreativos (CTLs) e as citocinas do microambiente estão envolvidos neste processo (JIANG et al., 1997; REIMER et al., 2003).

Embora os efeitos da DECH mostrarem função importante na erradicação das células malignas, permanece como um fator determinante na morbidade pós-transplante, qualidade de vida e sobrevivência, principalmente quando a terapia imunossupressiva em longo prazo é requerida para controlar esta complicação. Pode ser classificada em aguda e crônica.

1.5.1 DECH Aguda

A DECH aguda ocorre devidos a fatores como o enxerto tem células imunocompetentes, o receptor tem antígenos de HLA que são ausentes no doador e o sistema imunológico do receptor tem de ser incapaz de gerar uma resposta imune contra o enxerto, pelo menos em tempo suficiente (VOLTARELLI et al., 2009). O processo geralmente ocorre nas primeiras semanas após o transplante. As manifestações podem ser restritas a um órgão ou disseminadas com consequências debilitantes devido a contraturas articulares, perda da visão, insuficiência respiratória e mortalidade associada à imunossupressão crônica e infecções resultantes (TESHIMA et al., 2002). A DECH aguda atinge pele, fígado, pulmões e intestino (BALL e EGELER, 2008).

1.5.2 DECH Crônica

No caso da rejeição crônica o reconhecimento é indireto. As moléculas do HLA estranhas ao receptor são processadas pelas células apresentadoras de antígeno (APC) do receptor e os fragmentos de peptídeos, contendo resíduos de aminoácidos polimórficos, são

apresentados às células T. Embora o reconhecimento direto e indireto do aloantígeno geralmente conduz a um resultado adverso do enxerto, a indução da tolerância pode ocorrer após exposição do receptor aos aloantígenos do doador, antes do transplante (SOIFER et al., 2008). As moléculas de HLA podem dividir-se em duas categorias principais, alo-determinantes dominantes, que são eficientemente processadas e apresentadas às células T alo-reativas durante a rejeição o enxerto e alo-determinantes secretos que são potencialmente imunogênicos, mas não induzem normalmente a resposta imune, devido provavelmente ao processamento e/ou apresentação incompletos (ABBAS et al., 2005). A incidência de DECH crônica varia entre 6 e 80% de acordo com a idade do paciente, tipo de doador, fonte de célula-tronco, manipulação do enxerto e uso de infusões de linfócitos após o transplante. Ocorre mais tarde, e é definida arbitrariamente como a presença ou persistência de DECH além de 100 dias desde o transplante (RATANATHARATHORN et al., 2001; PEREIRA et al., 2010). A heterogeneidade da síndrome torna difícil não apenas o diagnóstico, mas também a avaliação da gravidade e os parâmetros de resposta. É caracterizada por fibrose e atrofia de um ou mais dos mesmos órgãos, sem evidências de morte celular aguda. Pode envolver também os pulmões. Quando grave, a DECH crônica induz a uma completa disfunção do órgão afetado e pode também ser fatal (SAKODA et al., 2007).

A análise de marcadores de linfócitos em TCTH mostrou-se uma ferramenta clínica útil no monitoramento terapêutico dos pacientes, na atividade da doença e para prever DECH como foi demonstrado por HESS et al., 2006 e SOIFFER et al., 2008.

A atividade tímica do receptor, as características biológicas do enxerto e os regimes de condicionamento são fatores que contribuem para o êxito da reconstituição imune, principalmente a reconstituição normal da célula T.

1.5.3 HIPÓTESE

A recuperação imunológica em pacientes com Anemia de Fanconi é diferente ou igual a outros pacientes transplantados?

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a reconstituição imunológica em pacientes com Anemia de Fanconi submetidos a transplante alogênico de medula óssea, através da análise das diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar por citometria de fluxo os linfócitos T, B e NK e subpopulações nas amostras de sangue periférico do paciente no pré e pós-transplante e controles (indivíduos saudáveis).
- 2) Analisar a resposta imune dos pacientes que receberam medula óssea aparentada e não-aparentada.
- 3) Identificar um marcador celular que possa avaliar fator preditivo de bom ou mau prognóstico na recuperação imune após o transplante de medula óssea.

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Pacientes

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de citometria de fluxo da Unidade de Apoio Diagnóstico-UAD, em colaboração com a Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO), ambos pertencentes ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os pacientes que participaram deste estudo foram diagnosticados no ambulatório de Anemia de Fanconi deste hospital. Os critérios de diagnóstico foram clínico e laboratorial, através do teste de diépoixibutano (DEB), que avalia quebras cromossômicas, características destes pacientes.

Foram incluídos no estudo vinte e três pacientes com anemia de Fanconi, mediana de idade de 8 anos, variando de 4 a 21; doze do sexo masculino, que realizaram TMO alogênico entre 2009 e 2011. Doze pacientes (52,0%) receberam o transplante de doadores aparentados e onze (48,0%) receberam transplante não aparentado. O regime de condicionamento para o grupo que recebeu MO de doador aparentado consistiu apenas na administração de ciclofosfamida – 60mg/Kg, enquanto que para outro grupo, não aparentado, o regime consistiu na combinação de ciclofosfamida com fludarabina – 125mg/m² e timoglobulina – 5mg/Kg. Para o tratamento imunoprolifático em ambos os grupos foram utilizados ciclosporina e metotrexato (Tabela 1).

A pega foi observada em 21 pacientes (91,0%), que foram acompanhados neste estudo por um período mínimo de um ano. Dois pacientes foram a óbito por DECH aguda no D +30 e o outro paciente por rejeição, 375 dias após o transplante (Tabela 1).

Todos os pacientes aceitaram participar por meio da assinatura do Termo de Consentimento/Assentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2 e Anexo 3 respectivamente) e este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sob o número 1599.016/2008-02 (Anexo 4).

Tabela 1 – Características dos Pacientes (n=23)

IDADE AO TRANSPLANTE (ANOS)	8	(4-21)
SEXO (MASC. / FEM.)	12 / 11	(54% / 46%)
HISTOCOMPATIBILIDADE		
HLA idêntico	20 / 23	(87%)
Uma incompatibilidade (HLA-A, B ou DR)	3 / 23	(13%)
DOADOR		
Aparentado	12 / 23	(52%)
Não aparentado	11 / 23	(48%)
REGIME DE CONDICIONAMENTO		
FLU/ATG/CFA	12 / 23	(52%)
Ciclofosfamida	9 / 23	(35%)
Fludarabina	1 / 23	(4%)
FLU/TBI	1 / 23	(4%)
IMUNOPROFILAXIA		
Ciclosporina+Metotrexato	21 / 23	(92%)
Ciclofosfamida	1 / 23	(4%)
Micofenolato	1 / 23	(4%)
DECH	13 / 22	(59%)
DECH aguda	5 / 22	(23%)
DECH crônica	8 / 21	(38%)
QUIMERISMO NO D+100		
Completo	12 / 23	(52%)
Misto	11 / 23	(48%)
ÓBITO	2 / 23	(9%)
DECH aguda	1 / 23	(4%)
Rejeição	1 / 23	(4%)

Resultados expressos como número de casos em percentagem (parênteses) e mediana. DECH= Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro; CFA=ciclofosfamida 60mg/Kg; FLU= fludarabina 125mg/ m²; ATG=timoglobulina 5mg/ m²; TBI 200 cGy. (*total body irradiation*); 200 cGy.

3.1.2 Amostras

As amostras de sangue periférico (SP) foram coletadas em tubos contendo 7.5% EDTA K3, tanto para a análise da imunofenotipagem em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) quanto para o hemograma (ADVIA 2120, Siemens, NY, EUA). Ao todo foram analisadas 161 amostras, nas quais fazem parte a amostra do pré-transplante aos dias subsequentes de cada um dos 23 pacientes, além das 20 amostras controle. A análise morfológica foi realizada através da microscopia convencional.

3.1.3 Infusão das Células-Tronco Hematopoéticas

A infusão das células-tronco hematopoéticas ocorreu no dia zero; D=0 (data do transplante). A pega do enxerto após o TMO foi definida como: 1) pega de neutrófilos: três dias consecutivos em que o número foi >500 células/ μl ; 2) pega de plaquetas: primeiro dia em que o número de plaquetas foi $>20.000/\mu\text{l}$, sem que o paciente tenha recebido infusão de plaquetas nos últimos 7 dias.

3.1.4 Seguimento do Paciente Após o Transplante

Os pacientes permaneceram internados na Unidade de TMO do HC-UFPR por um período médio de 30 dias após o transplante e posteriormente, o seguimento foi ambulatorial intensivo (diário a semanal) no ambulatório do TMO. Foram colhidas amostras de sangue periférico dos pacientes nos seguintes períodos: pré-condicionamento (amostras foram coletadas poucas horas antes do início do condicionamento), e nos dias D+30, D+60, D+100, D+180, D+270, D+360 pós TMO. As coletas das amostras de sangue periférico foram adaptadas aos retornos dos pacientes ao hospital após o transplante. Portanto, nem sempre as datas das coletas coincidiram exatamente com as datas programadas citadas anteriormente.

A maioria dos pacientes possui amostras coletadas de todos os períodos citados acima. As raras amostras perdidas foram devidas principalmente, ao não comparecimento do paciente aos retornos determinados (cidades distantes).

3.1.5 Controles

As amostras de sangue periférico dos controles, indivíduos saudáveis, sem doenças pré-existentes, foram obtidas de pacientes pertencentes à Clínica de Cirurgia da Ortopedia/Traumatologia do Hospital de Clínicas da UFPR, em situação pré-cirúrgica, sob consentimento/assentimento informado TCLE (Anexo 2 e anexo 3 respectivamente).

Foram coletadas vinte amostras de sangue periférico pareadas às idades dos pacientes. Os valores absolutos de leucócitos totais, linfócitos, monócitos e neutrófilos foram obtidos pela contagem hematológica realizada em contador automático. Os resultados constam no Anexo 5.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Análise Multiparamétrica por Citometria de Fluxo das Subpopulações Linfocitárias

Foi utilizada a técnica convencional de cora-lisa para a citometria de fluxo. Resumidamente, 100 µl de sangue total foi incubado por 15 minutos, no escuro, à temperatura ambiente (PAOLI et al., 1984), com anticorpos monoclonais (Acmo) previamente titulados, conjugados aos fluorocromos – Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE), Proteína Peridínica Clorofila (PerCP), Aloficocianina (APC) (Tabela 2).

Em paralelo foi processado amostra do grupo controle. As hemácias foram lisadas usando a solução de FACS *Lysing solution* (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) (protocolo do fabricante: http://wwwbdbiosciences.com/external_files/is/doc/tds/Package_Inserts_CE/live/web_enabled/23-1358-06.pdf). Após, as células foram centrifugadas e duplamente lavadas em tampão salino (PBS pH 7,4). Para a análise intracelular do marcador FOXP3 foi utilizado o reagente Fix&Perm (Invitrogen, Camarillo, CA, EUA), após a marcação de membrana, como recomendado pelo fabricante (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/L12001_Rev0310.pdf).

As aquisições dos dados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur imediatamente após a preparação da amostra. Em cada tubo foram adquiridos um mínimo de 100.000 eventos usando o programa de aquisição CellQUEST (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para a análise dos dados foi utilizado o programa Infinicity (Cytognos SL, Salamanca, Espanha).

A estratégia de análise consistiu na identificação e quantificação dos diferentes subgrupos linfocitários, como exemplificado nas Figuras 1 e 2. A contagem absoluta de linfócitos foi calculada através de plataforma dupla, multiplicando a percentagem de linfócitos obtida por citometria de fluxo pelo número de leucócitos obtido no hemograma. A partir daí foram calculadas as subpopulações linfocitárias em número absoluto.

Foram identificadas as seguintes subpopulações linfocitárias: CD3⁺ (linfócito T), CD3⁺CD4⁺ (linfócito T auxiliar), CD3⁺CD8⁺ (linfócito T citotóxico), CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ (linfócito T recém-emigrado do timo), CD57⁺CD28⁻CD4⁺ ou CD8⁺ (linfócito T senescente), CD27⁺CD45RO⁻CD4⁺ ou CD8⁺ (linfócito T virgem), CD27⁺CD45RO⁺CD4⁺ ou CD8⁺ (linfócito T de memória central), CD27⁻CD45RO⁺CD4⁺ ou CD8⁺ (linfócito T efetor), CD27⁻CD45RO⁻CD4⁺ ou CD8⁺ (linfócito T efetor tardio), CD3⁺CD69⁺ (linfócito T ativado) e CD3⁻CD69⁺ (outros linfócitos ativados), CD4⁺CD25^{fo}CD127^{tr}FOXP3⁺ (linfócito T regulador=Treg), CD4⁺CD25⁺⁺GITR⁺FOXP3⁺ (Treg), CD3⁺CD16⁺ e/ou CD56⁺ (linfócito NKT), CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ (linfócito T/TCR $\alpha\beta$), CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ (linfócito T/TCR $\gamma\delta$), CD19⁺CD20⁺ (linfócito B maduro), CD19⁺CD10⁺ (linfócito B imaturo) e CD3⁻CD16⁺CD56⁺ (linfócito NK). Adicionalmente, foi determinado o número de linfócitos T e B que expressavam os marcadores Fas (CD95⁺) e FasL (CD178⁺): CD3⁺Fas⁺, CD3⁺FasL⁺, CD19⁺Fas⁺ e CD19⁺FasL⁺ (Douek, 2002; Fallen et al., 2003) (Tabela 2).

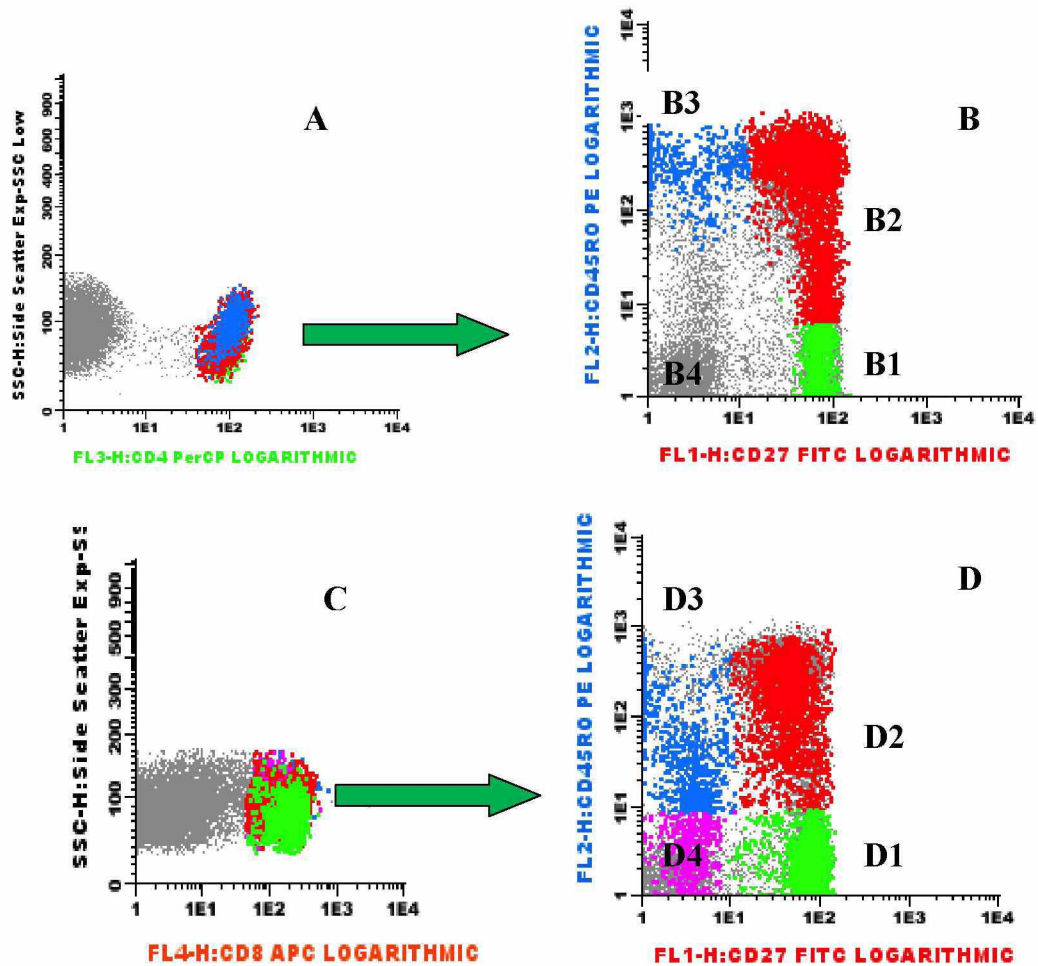


Figura 1 – Estratégia de análise bivariada das subpopulações linfocitárias T. Painel **A**. Características de complexidade (side light scatter-SSC) dos linfócitos T $CD4^+$, Painel **B**. **B.1.** Virgem ($CD27^+CD45RO^-$), **B.2.** Memória ($CD27^+CD45RO^+$), **B.3.** Efetor ($CD27^-CD45RO^+$), **B.4.** Efetor tardio ($CD27^-CD45RO^-$). Painel **C**. Características de complexidade (side light scatter-SSC) dos linfócitos T $CD8^+$, Painel **D**. **D.1.** Virgem ($CD27^+CD45RO^-$), **D.2.** Memória ($CD27^+CD45RO^+$), **D.3.** Efetor ($CD27^-CD45RO^+$), **D.4.** Efetor tardio ($CD27^-CD45RO^-$).

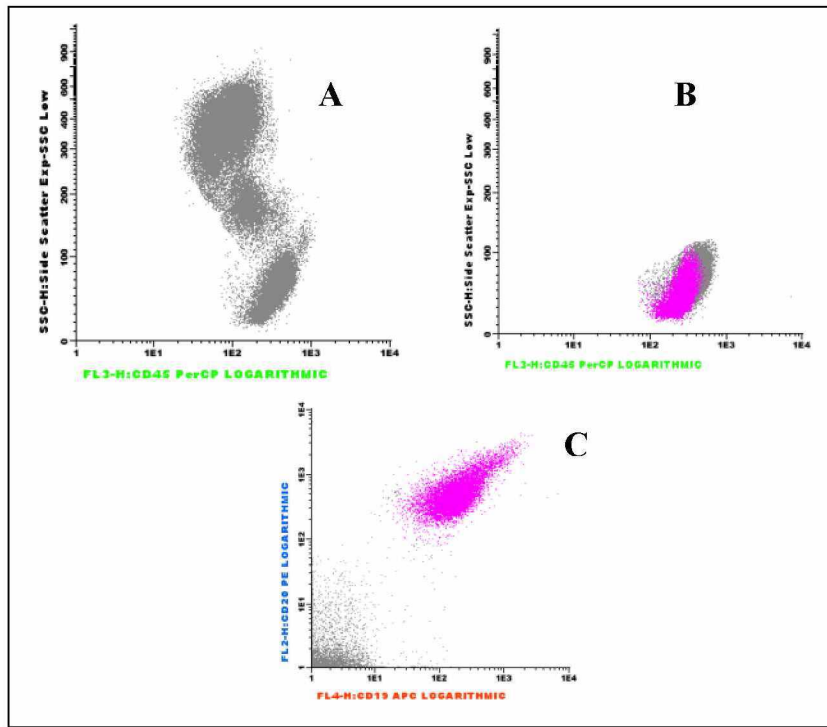


Figura 2 – Estratégia de análise bivariada das subpopulações linfocitárias B. Painel **A.** Características de tamanho (forward light scatter-FSC) vs complexidade (side light scatter-SSC) dos leucócitos. Painel **B.** Complexidade (side light scatter-SSC) vs CD45 forte (linfócitos). Painel **C.** Linfócitos B maduros (CD19⁺CD20⁺).

Tabela 2 – Anticorpos Monoclonais e Fluorocromos Utilizados na Citometria de Fluxo de Sangue Periférico para Detecção das Populações Linfocitárias e Painéis Correspondentes

AcMo	Fluorocromo	Clone	Companhia
CD3	FITC	SK7	BD Biosciences
CD3	PECy5	SK7	IQP
CD4	PerCP	SK3	BD Biosciences
CD4	APC	SK3	BD Biosciences
CD8	PE	SK1	BD Biosciences
CD8	APC	SK1	BD Biosciences
CD10	PE	HI10	BD Biosciences
CD16	PE	B-E16	IQP
CD19	PE	HIB19	Biolegend
CD19	APC	SJ25C1	Invitrogen
CD20	FITC	L27	BD Biosciences
CD25	FITC	M-A251	BD Biosciences
CD27	FITC	L128	BD Biosciences
CD28	PE	CD28.8	EXBIO
CD31	PE	WM59	BD Biosciences
CD45	PerCP	2D1	BD Biosciences
CD45RA	FITC	L48	BD Biosciences
CD45RO	PE	UCHL1	IQP
CD56	PE	MOC-1	IQP
CD57	FITC	TB01	Serotec
CD69	PerCP	FN50	BD Biosciences
CD95	FITC	DX2	BD Biosciences
CD127	PE	HIL-7R-M21	BD Biosciences
CD178	PE	Kay-10	BD Biosciences
FOXP3	APC	PCH101	eBiosciences
GITR	PE	TNFRSF18	eBiosciences
TCR $\alpha\beta$	FITC	T10B9.1A-31	BD Biosciences
TCR $\gamma\delta$	PE	V65	BD Biosciences

Painel de anticorpos monoclonais

FITC	PE	PERCP or PECy5	APC	Tipo celular identificado
CD3	CD8	CD45	CD4	Linfócitos T total e subpopulações
CD3	CD16/56	CD45	-	Linfócitos NK e NKT
CD20	CD10	CD45	CD19	Linfócitos B imaturos e maduros
TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$	CD4	CD8	Linfócitos T com receptor $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$
CD45RA	CD31	CD4	CD8	Linfócitos T recém-emigrados do timo
CD57	CD28	CD4	CD8	Linfócitos T senescentes
CD27	CD45RO	CD4	CD8	Linfócitos T virgem, mc, efetor e ed
CD3	CD19	CD69	-	Linfócitos ativados
CD95	CD178	CD3	CD19	Apoptose celular
CD25	CD127	CD4	cyFOXP3	Linfócitos T reguladores
CD25	GITR	CD4	cyFOXP3	Linfócitos T reguladores

Nomenclatura dos anticorpos monoclonais, fluorocromos, clones, companhia e painéis.

Cy= coloração citoplasmática.

FITC; isotiocianato de fluoresceína, PE; R-ficoeritrina, PERCP; complexo proteína peridina clorofila, PECy5; ficoeritrina – cianina 5 (conjugado tandem), APC; alofocianina.

mc=memória central e ed=efetor diferenciado ou tardio.

3.3 AVALIAÇÃO DA TIPAGEM HLA E DO QUIMERISMO

Os dados da Tipagem HLA e do Quimerismo foram fornecidos pelo responsável do Laboratório de Imunogenética do HC/UFPR. Após o transplante de medula óssea alogênico, dois estados de quimerismo foram reconhecidos; o quimerismo completo, quando todas as células do tecido hematopoético são do doador e o quimerismo misto, quando no tecido convivem as células do doador e do receptor (Tabela 1).

3.4 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A significância estatística das análises das células estudadas foi avaliada longitudinalmente por modelos de efeitos mistos. Para mensurar a significância estatística entre os diferentes grupos foram utilizados os testes não paramétricos de Wilcoxon e de Mann-Whitney (Statistica v.8.0 *software* - Stat Soft, OK, EUA). Valores de $P < 0.05$ foram considerados como estatisticamente significantes. Para a comparação da avaliação pré-tx com as avaliações consecutivas, foi considerado o teste não paramétrico de Wilcoxon e Teste t de Student para amostras independentes. Qualquer valor fora desses limites são os outliers (valores atípicos), acusado nos gráficos com um círculo cheio.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA APÓS O TMO

4.1.1 Leucócitos Após Alo-TMO

Após o condicionamento (imunossupressão) e o TMO, houve um período de imunoablação que atingiu todos os pacientes, observado na primeira semana pós-tx, pelo número de leucócitos totais no sangue periférico (Tabela 3). Em seguida, houve a reconstituição imunológica e hematopoética a partir das células tronco hematopoéticas alogênicas infundidas nos pacientes e células residuais que eventualmente sobreviveram ao regime de condicionamento. Após o transplante, a pega da medula óssea ocorreu em todos os pacientes analisados entre os dias 12 (MO aparentada) e 25 (MO não aparentada) para os neutrófilos e 11 (MO aparentada) e 32 dias (MO não aparentada) para as plaquetas.

Tabela 3 – Número de Leucócitos no D+7 e D+30

Controle	Leucócitos/ μ L	Paciente	D+7 Leucócitos/ μ L	D+30 Leucócitos/MI
1	6.049	1	0,010	1.050
2	8.056	2	0,055	2.900
3	6.670	3	0,570	9.540
4	7.100	4	0,080	1.980
5	8.030	5	0,150	3.750
6	5.240	6	0,130	4.330
7	5.230	7	0,310	22.270
8	7.640	8	0,070	2.920
9	9.190	9	0,040	3.680
10	7.080	10	0,200	4.630
11	5.720	11	0,250	5.800
12	9.220	12	0,230	3.650
13	7.570	13	0,010	3.140
14	5.070	14	0,070	3.380
15	6.690	15	0,520	3.830
16	11.340	16	0,050	3.370
17	7.060	17	0,010	3.570
18	8.020	18	0,060	2.820
19	4.840	19	0,030	1.720
20	10.190	20	0,028	6.990
		21	0,120	3.520
		22	0,015	2.530
		23	0,020	7.970
Mediana	7.095	Mediana	0,07	3.570
Mínimo	4.840	Mínimo	0,01	1.050
Máximo	11.340	Máximo	0,57	22.270

No D+30 após-tx, o número de leucócitos totais aumentou em relação ao pré-tx (Figura 3A), porém não foi significativo, e se manteve em número normal em todo o período analisado, assim como os neutrófilos, monócitos e linfócitos (Figura 3).

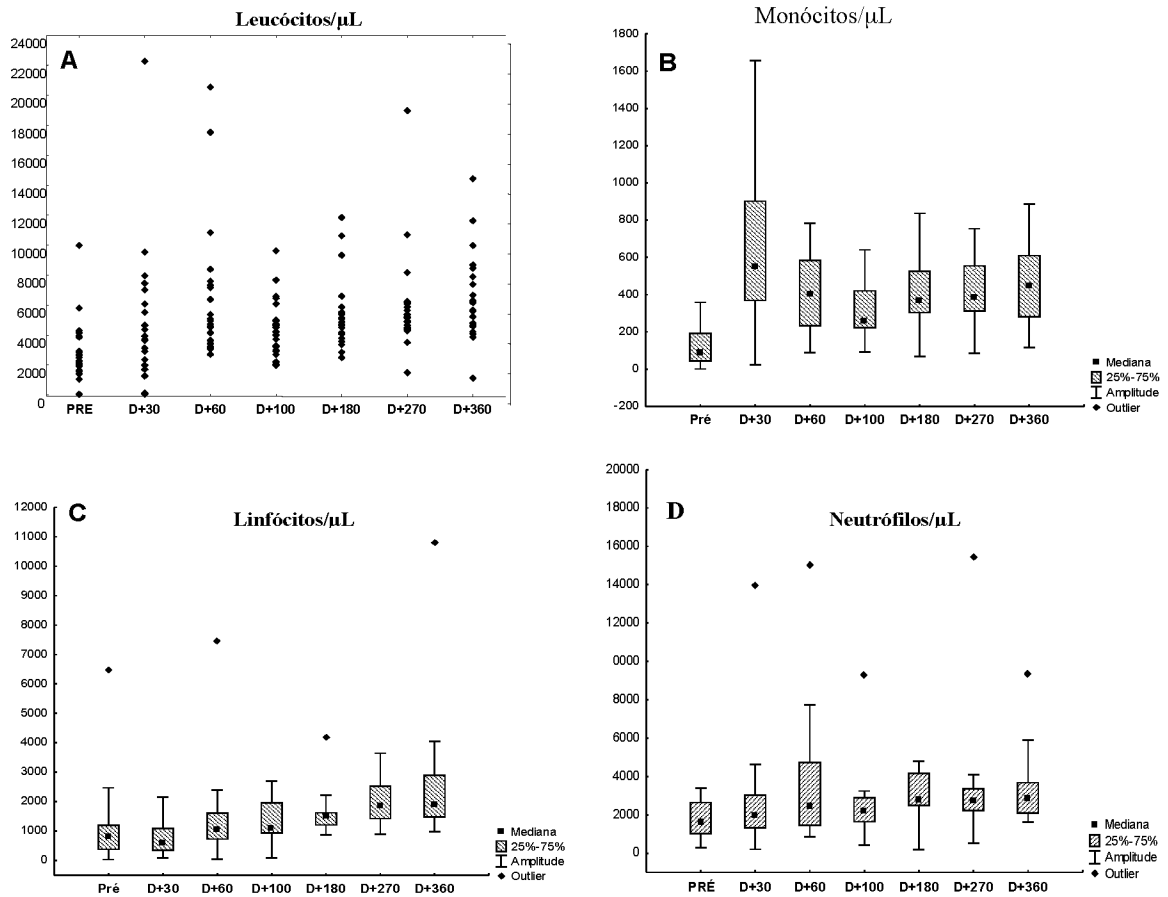


Figura 3 – Reconstituição de Leucócitos Totais, Linfócitos, Monócitos e Neutrófilos em Pacientes com Anemia de Fanconi Após o TMO. Valores absolutos (eixo Y=células/ μ L; eixo X=tempo em meses) de leucócitos totais (A), monócitos (B) e linfócitos (C) e de neutrófilos (D). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, os pontos dentro das caixas indicam a média, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os círculos cheios indicam os valores *outliers*. Períodos analisados: Pré-transplante e pós-transplante (D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360).

O número de linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos nas amostras pré-tx encontraram-se significativamente diminuídos em relação aos controles ($P < 0,001$) (Tabela 4). No período pós-tx analisado, no D+360 (Tabela 5), a recuperação dos linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos, atingiram a normalidade. Não houve diferença estatística neste período.

Os linfócitos NK $CD3^-CD16^+$ e/ou $CD56^+$ foram as primeiras células linfoides a recuperar após o transplante, seguidos pelos linfócitos T citotóxicos $CD3^+CD8^+$, linfócitos B $CD19^+$ e finalmente, linfócitos T auxiliares $CD3^+CD4^+$.

Tabela 4 – Análise Comparativa do Grupo Controle vs Pacientes (Pré-TMO) Quanto ao Número Absoluto de Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos e Neutrófilos

Variável/ μL	Grupo	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
Linfócitos	Controle	20,0	2858,8	1354,7	6263,9	
	Paciente	23,0	886,0	28,8	6455,1	<0,001 ^a
Monócitos	Controle	20,0	446,6	28,5	704,5	
	Paciente	23,0	93,3	0,5	441,2	<0,001 ^a
Eosinófilos	Controle	20,0	282,1	68,3	627,2	
	Paciente	23,0	3,5	0,0	44,5	<0,001 ^a
Neutrófilos	Controle	20,0	3490,5	1395,4	6914,0	
	Paciente	23,0	1540,9	281,1	3389,6	<0,001 ^b

^a Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$

^b Teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$

Tabela 5 – Análise Comparativa do Grupo Controle vs Pacientes (Pós-TMO, D+360) Quanto ao Número Absoluto de Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos e Neutrófilos.

Variável/ μL	Grupo	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
Linfócitos	Controle	20	2858,8	1354,7	6263,9	
	Pacientes	23	1890,0	970,0	10802	0,519 ^a
Monócitos	Controle	20	446,6	28,5	704,5	
	Pacientes	23	440,3	115,2	1352	0,637 ^a
Eosinófilos	Controle	20	282,1	68,3	627,2	
	Pacientes	23	196,2	30,5	1105	0,615 ^a
Neutrófilos	Controle	20	3490,5	1395,4	6914,0	
	Pacientes	23	2800,2	1614,1	17460	0,238 ^b

^a Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$

^b Teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$

4.1.2 Linfócitos T Após Alo-TMO

Em relação aos linfócitos T CD3⁺, houve diminuição, porém não foi estatisticamente significante em todos os períodos pós-tx analisados ($P=0,191$ no D+30; $P=0,520$ no D+60; $P=0,159$ no D+100). Nos dias D+180, D+270 e D+360, houve aumento significativo ($P=0,001$), quando comparados aos valores pré-tx (Figura 4A).

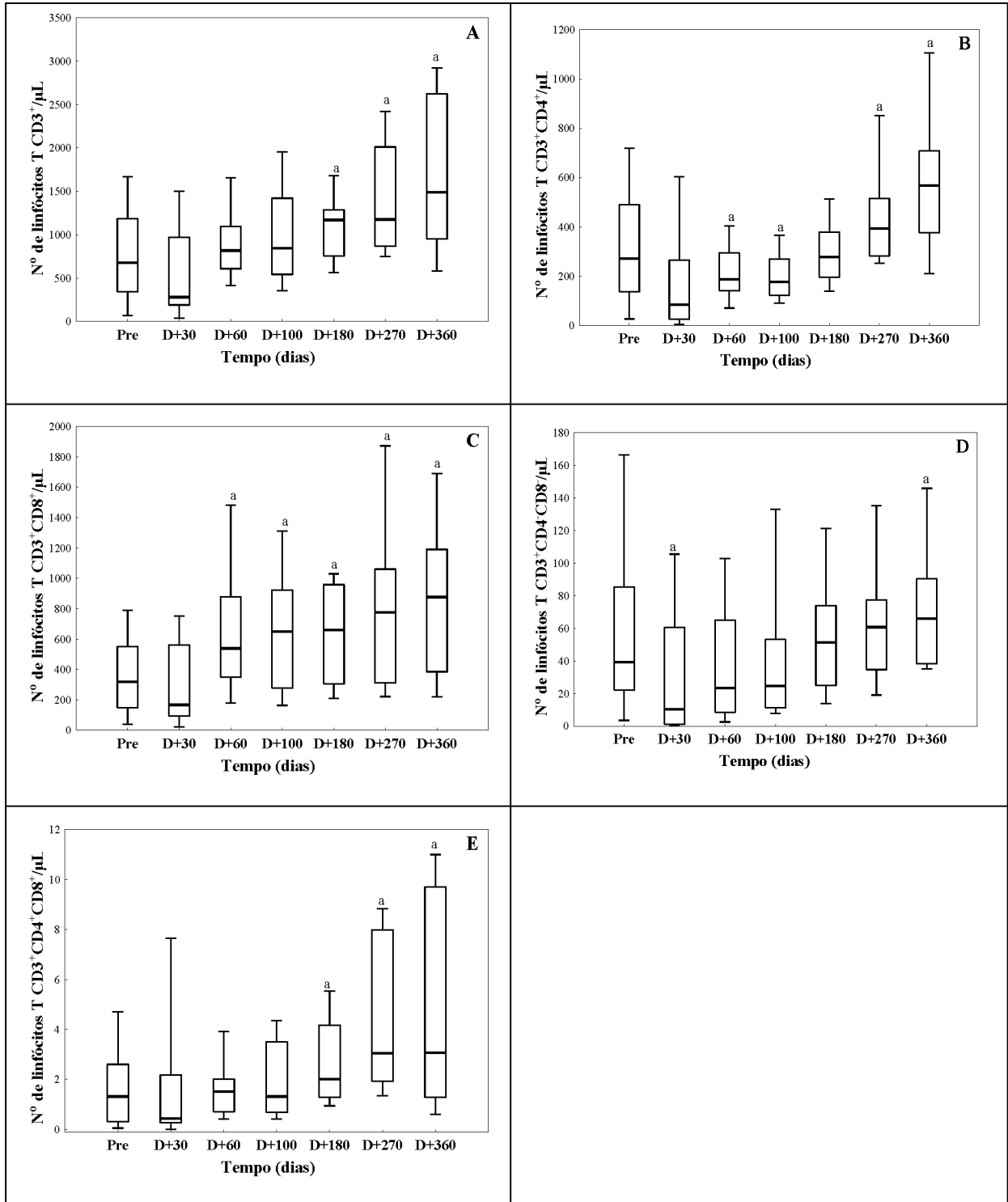


Figura 4 – Reconstituição de Linfócitos T no Pré-tx no Pós TMO. Valores absolutos (células/μL) de linfócitos T CD3⁺ (A), linfócitos T auxiliares CD3⁺CD4⁺ (B), linfócitos T citotóxicos CD3⁺CD8⁺ (C), linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD8⁻ e de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD8⁺ (E). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. ^a = $P < 0,05$. Períodos analisados: Pré-transplante, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360 dias pós-transplante.

Entre os linfócitos T CD3⁺, o número de linfócitos TCD3⁺TCRαβ⁺ acompanhou a curva do CD3⁺, porém o número de linfócitos T CD3⁺TCRγδ⁺ (CD4⁻CD8⁻) (Figura 4 D) encontrou-se diminuído significativamente no D+30 pós-tx ($P=0,030$), aumentando

posteriormente, porém com significância estatística apenas no D+360 (Tabela 6).

Tabela 6 – Linfócitos CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (TCR $\gamma\delta$ ⁺)/ μ L

CD4⁺CD8⁻	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	39,5	0,1	170,2
D+30	23	10,4	0,2	146,7
D+60	22	23,4	0,8	116,1
D+100	22	24,7	0,9	164,5
D+180	21	51,5	6,5	138,5
D+270	21	60,8	5,4	165,3
D+360	21	66,1	3,6	241,9

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,030$; Pré x D+60, $P=0,184$; Pré x D+100, $P=0,398$; Pré x D+180, $P=1,00$; Pré x D+270, $P=0,094$; Pré x D+360, $P=0,048$.

Após o transplante, ocorreu diminuição de linfócitos T CD4⁺ nos dias D+60 e D+100 no seguimento pós-tx ($P=0,044$ e $P=0,036$, respectivamente) (Figura 4B) e um aumento marcante de linfócitos T CD8⁺ pós-tx, a partir do D+60 (D+60 $P=0,049$; D+100 $P=0,024$; D+180 $P=0,030$; D+270 $P=0,005$ e D+360 $P=0,003$) (Figura 4C). O número de células T CD4⁺ apresentou uma tendência a aumentar após o tx, chegando a um valor significativo nos dias D+270 e D+360 ($P=0,003$ e $P=0,004$, respectivamente) em relação ao pré-tx, porém, mesmo um ano após o TMO, não atingiu o valor do grupo controle (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 – Análise Comparativa dos Linfócitos T Entre os Pacientes Pré-Tx e Grupo Controle

Variável/ μ L	Grupo	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD3 ⁺	Controle	20,0	1920,0	988,0	4293,4	<0,001
	Paciente	23,0	674,2	14,9	4571,5	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	Controle	20,0	1007,2	515,5	2446,7	<0,001
	Paciente	23,0	272,6	7,2	2474,2	
CD3 ⁺ CD8 ⁺⁺	Controle	20,0	665,1	352,3	1520,9	0,001
	Paciente	23,0	321,4	7,3	1817,1	
CD4 ⁺ CD8 ⁺	Controle	20,0	2,6	1,4	13,4	0,007
	Paciente	23,0	1,3	0,0	5,8	
CD4 ⁺ CD8 ⁻	Controle	20,0	132,2	62,7	353,2	<0,001
	Paciente	23,0	39,5	0,1	170,2	

Tabela 8 – Análise Comparativa dos Linfócitos T entre os Pacientes Pós-Tx (D+360) e Grupo Controle

Variável/ μL	Grupo	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD3 ⁺	Controle	20	1920,0	988,0	4293,4	
	Paciente	21	1487,7	469,8	10111,0	0,199
CD3 ⁺ CD4 ⁺	Controle	20	1007,2	515,5	2446,7	
	Paciente	21	567,0	16,3	1248,1	0,000
CD3 ⁺ CD8 ⁺⁺	Controle	20	665,1	352,3	1520,9	
	Paciente	21	876,8	72,4	8813,6	0,544
CD4 ⁺ CD8 ⁺	Controle	20	2,6	1,4	13,4	
	Paciente	21	3,1	0,1	25,9	0,786
CD4 ⁺ CD8 ⁻	Controle	20	132,2	62,7	353,2	
	Paciente	21	66,1	3,6	241,9	0,000

O aumento de linfócitos T CD8⁺ foi significativo a partir dos três primeiros meses pós-tx (Figura 4C e Tabela 9). A diminuição dos linfócitos T CD4⁺ e o aumento de linfócitos T CD8⁺ resultaram na inversão da relação CD4⁺/CD8⁺ em todo o período analisado. Por sua vez, os linfócitos T duplo-positivos, CD3⁺CD4⁺CD8⁺, foram significativamente maiores em relação aos níveis pré-transplante, a partir do D+180 ($P=0,040$) até o final deste estudo (D+360 $P=0,008$) (Figura 4E).

Tabela 9 – Linfócitos T citotóxicos CD3⁺CD8⁺⁺/ μL

CD3 ⁺ CD8 ⁺⁺	n	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	321,4	7,3	1817,1
D+30	23	167,6	8,8	1656,2
D+60	22	536,6	18,6	5879,1
D+100	22	650,9	37,7	1801,9
D+180	21	661,9	57,0	1998,3
D+270	21	775,7	62,4	2798,8
D+360	21	876,8	72,4	8813,6

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,526$; Pré x D+60, $P=0,049$; Pré x D+100, $P=0,024$; Pré x D+180, $P=0,030$; Pré x D+270, $P=0,005$; Pré x D+30, $P=0,003$.

4.1.3 Linfócitos B Após Alo-TMO

Os linfócitos B maduros ($CD19^+CD20^+$) e os mais imaturos ($CD19^+CD10^+$), diminuíram acentuadamente no D+30, no entanto, recuperaram lentamente no D+100 e D+60, respectivamente, atingindo valores significativamente aumentados quando comparados aos níveis do pré-transplante a partir do D+180 e D+270, respectivamente (Figuras 5A e 5B).

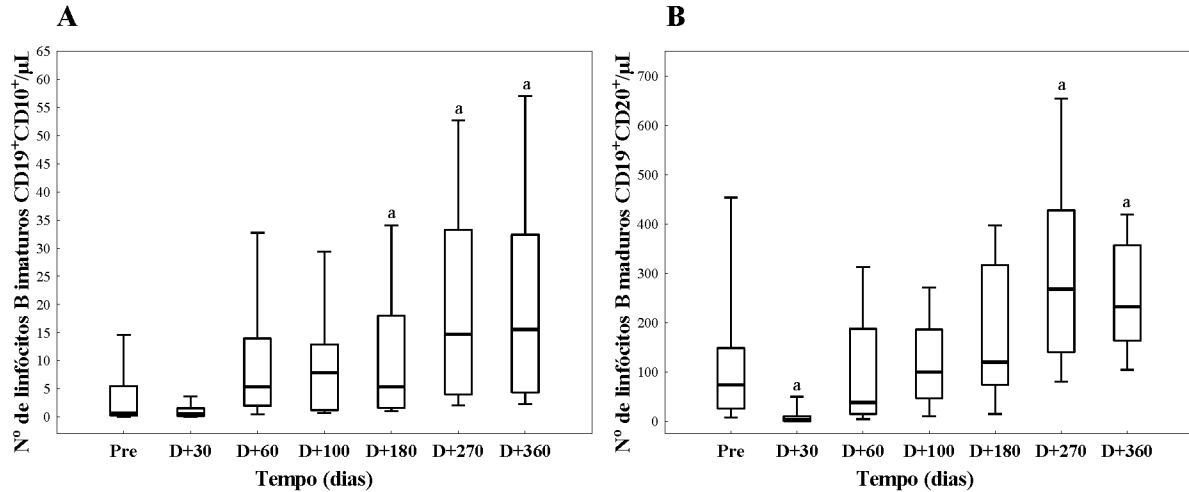


Figura 5 – Reconstituição de Linfócitos B, Pré e Pós TMO. Valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos B imaturos $CD19^+CD10^+$ (A) e linfócitos B maduros $CD19^+CD20^+$ (B). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. ^a = $P < 0,05$. Períodos analisados: Pré-transplante, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360 dias pós-transplante.

4.1.4 Linfócitos NK Após Alo-TMO

A reconstituição das células NK $CD3^+CD16^+CD56^+$ (Natural-Killer) foi rapidamente evidenciada. O número absoluto de células NK aumentou significativamente logo após o transplante, mantendo-se com valores aumentados em todo o processo de acompanhamento (Tabela 10, Figura 6).

Como mencionado acima, as células NK tiveram um pico entre os dias D+30 e D+60, diminuindo discretamente em seguida, porém os valores mantiveram-se aumentados se comparados aos níveis do pré-transplante (Figura 6).

$3^{-}16^{+}56^{+}$	n	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	65,2	1,0	544,7
D+30	23	155,6	17,6	979,3
D+60	22	299,6	11,9	896,1
D+100	22	179,8	16,7	493,7
D+180	21	155,4	45,5	659,1
D+270	21	201,6	56,4	1038,4
D+360	21	173,5	77,4	684,2

Tabela 10 – Linfócitos NK/ μ L

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,040$; Pré x D+60, $P=0,013$; Pré x D+100, $P=0,022$; Pré x D+180, $P=0,016$; Pré x D+270, $P=0,007$; Pré x D+30, $P=0,005$.

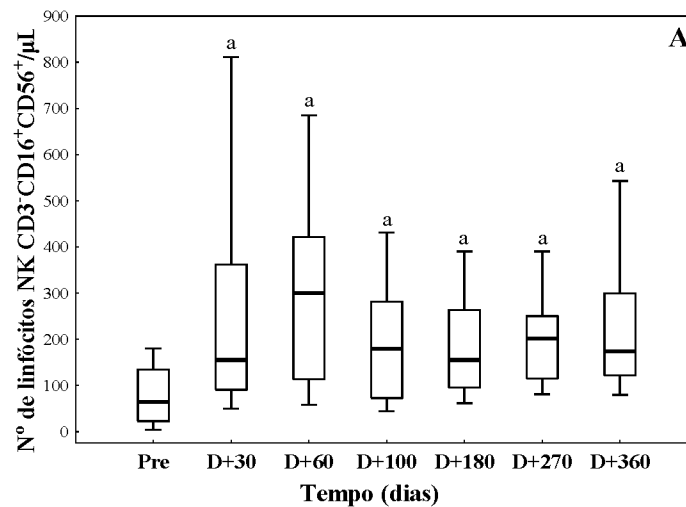


Figura 6 – Reconstituição de Linfócitos NK Pré-tx e Após o TMO. Valores absolutos (células/ μ l) de linfócitos B imaturos CD3-CD16+CD56+ (A). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Períodos analisados: Pré-transplante, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360 dias pós-transplante. ^a Teste t de Student para amostras independentes, $P<0,05$.

4.1.5 Linfócitos NKT Após Alo-TMO

As células NKT foram definidas com as positivities para os marcadores de células NK (CD16 e CD56) e de células T (CD3). A Figura mostra que o número de células NKT

CD3⁺CD16⁺CD56⁺ não diminuiu após o TMO, e começou a aumentar seis meses pós-tx, e esse aumento persistiu até D+360 e estas diferenças foram significantes ($P<0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Linfócitos NKT/ μ L

3⁺16⁺56⁺	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	52,5	1,0	165,3
D+30	23	27,3	0,9	730,3
D+60	22	82,0	1,9	1479,4
D+100	21	78,2	10,1	300,8
D+180	21	109,5	16,5	983,7
D+270	21	150,8	18,8	979,3
D+360	21	107,6	27,2	1406,5

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,433$; Pré x D+60, $P=0,421$; Pré x D+100, $P=0,157$; Pré x D+180, $P=0,013$; Pré x D+270, $P=0,001$; Pré x D+30, $P=0,016$.

4.1.6 Outras Populações de Linfócitos T Após Alo-TMO

Para avaliar o efeito do TMO nas subpopulações de linfócitos T virgem, efetores e de memória, foram utilizados marcadores fenotípicos que permitem distinguir os vários estágios de diferenciação funcional dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Estes estágios incluem linfócitos T virgem CD27⁺CD45RO⁻ (CD4⁺ ou CD8⁺), linfócitos T de memória central CD27⁺CD45RO⁺ (CD4⁺ ou CD8⁺), linfócitos T de memória efetora CD27⁻CD45RO⁺ (CD4⁺ ou CD8⁺) e de linfócitos T efetores diferenciados CD27⁻CD45RO⁻(CD4⁺ ou CD8⁺). Os valores das subpopulações de células T CD8 efetora e das células T CD4 de memória efetora aumentaram 60 dias após o transplante, as células T CD4⁺ efetoras terminais mostraram uma recuperação mais tardia, com um aumento significativo após o transplante apenas no D+180. Quanto aos linfócitos T auxiliares CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺, de memória central, não houve mudanças significativas ao longo de todo o período do acompanhamento. Estes resultados estão demonstrados da Tabela 12 a Tabela 19 e Figuras 7 e 8.

Tabela 12 – Linfócitos T Naive CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻/μL

27⁺45RO⁻	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	99,7	3,2	2076,0
D+30	23	1,8	0,0	255,4
D+60	22	1,8	0,0	110,8
D+100	22	5,2	0,3	410,4
D+180	21	82,5	0,0	438,3
D+270	21	150,4	2,0	748,8
D+360	21	241,2	1,1	810,6

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,005$; Pré x D+60, $P<0,001$; Pré x D+100, $P=0,002$; Pré x D+180, $P=0,260$; Pré x D+270, $P=0,053$; Pré x D+30, $P=0,004$.

Tabela 13 – Linfócitos T Memória CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺/μL

27+45RO+	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	114,4	1,5	625,1
D+30	23	43,2	1,2	707,6
D+60	22	91,5	18,7	280,6
D+100	22	92,7	8,6	410,4
D+180	21	114,3	43,7	306,9
D+270	21	175,2	12,4	287,4
D+360	21	162,6	83,2	311,1

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,433$; Pré x D+60, $P<0,314$; Pré x D+100, $P=0,295$; Pré x D+180, $P=0,778$; Pré x D+270, $P=0,094$; Pré x D+30, $P=0,058$.

Tabela 14 – Linfócitos T Efetor CD4⁺CD27⁻CD45RO⁺/μL

27-45RO+	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	20,1	0,1	52,0
D+30	23	21,3	1,0	138,3
D+60	22	49,5	11,8	448,1
D+100	22	59,8	1,8	259,3
D+180	21	68,7	1,2	251,0
D+270	21	77,9	30,8	229,6
D+360	21	99,4	10,3	830,7

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,794$; Pré x D+60, $P=0,001$; Pré x D+100, $P=0,001$; Pré x D+180, $P=0,002$; Pré x D+270, $P<0,001$; Pré x D+30, $P<0,001$.

Tabela 15 – Linfócitos T Efetor Dif. CD4⁺CD27⁻CD45RO⁻/μL

27-45RO-	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	0,8	0,0	15,2
D+30	23	0,8	0,0	35,1
D+60	22	1,3	0,1	46,9
D+100	22	2,2	0,1	47,5
D+180	21	3,7	0,8	101,1
D+270	21	3,0	1,4	52,1
D+360	21	7,4	0,6	65,9

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,794$; Pré x D+60, $P=0,421$; Pré x D+100, $P=0,295$; Pré x D+180, $P=0,006$; Pré x D+270, $P=0,010$; Pré x D+30, $P=0,004$.
Dif.=diferenciado.

Tabela 16 – Linfócitos T Naive CD8⁺CD27⁺CD45RO⁻/μL

27+45RO	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	72,2	0,0	389,7
D+30	23	11,5	0,0	615,0
D+60	22	16,9	0,0	279,9
D+100	22	16,3	0,0	450,2
D+180	21	15,3	0,0	342,8
D+270	21	22,6	0,0	583,1
D+360	21	9,7	0,0	474,4

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,263$; Pré x D+60, $P=0,016$; Pré x D+100, $P=0,059$; Pré x D+180, $P=0,030$; Pré x D+270, $P=0,396$; Pré x D+30, $P=0,267$.

Tabela 17 – Linfócitos T Memória CD8⁺CD27⁺CD45RO⁺/μL

27+45RO+	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	63,4	1,1	1584,7
D+30	23	71,3	5,9	1178,4
D+60	22	188,4	9,4	1570,6
D+100	22	143,9	11,1	389,9
D+180	21	203,7	25,1	675,1
D+270	21	193,4	32,4	668,7
D+360	21	206,1	7,4	622,0

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=1,00$; Pré x D+60, $P=0,070$; Pré x D+100, $P=0,147$; Pré x D+180, $P=0,049$; Pré x D+270, $P=0,008$; Pré x D+30, $P=0,012$.

Tabela 18 – Linfócitos T Efetor CD8⁺CD27⁻CD45RO⁺/μL

27-45RO⁺	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	18,0	0,0	232,4
D+30	23	9,6	0,4	420,1
D+60	22	130,2	1,5	1972,6
D+100	22	206,8	11,6	1410,4
D+180	21	254,3	10,3	1259,0
D+270	21	349,1	10,7	1583,4
D+360	21	501,0	17,7	6895,1

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,411$; Pré x D+60, $P=0,001$; Pré x D+100, $P<0,001$; Pré x D+180, $P<0,001$; Pré x D+270, $P<0,001$; Pré x D+30, $P<0,001$.

Tabela 19 – Linfócitos T Efetor Dif. CD8⁺CD27⁻CD45RO⁻/μL

27-45RO⁻	N	Mediana	Mínimo	Máximo
PRÉ	20	1,8	0,0	452,8
D+30	23	5,6	0,0	469,6
D+60	22	35,0	0,0	2056,0
D+100	22	52,5	0,0	738,3
D+180	21	87,3	0,0	480,3
D+270	21	31,3	0,0	1034,3
D+360	21	27,4	0,3	1556,6

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,191$; Pré x D+60, $P=0,107$; Pré x D+100, $P=0,064$; Pré x D+180, $P=0,022$; Pré x D+270, $P=0,031$; Pré x D+30, $P=0,157$. Dif.: diferenciado.

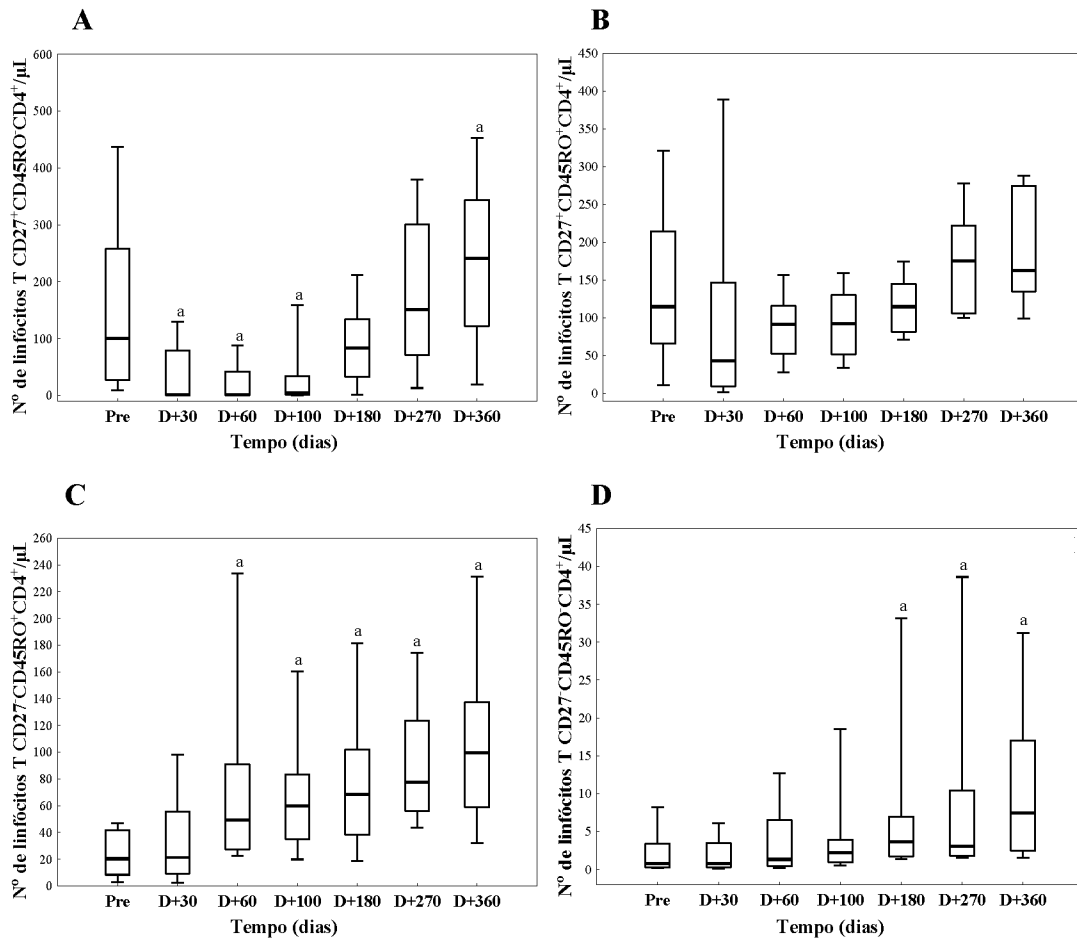


Figura 7 – Reconstituição de Linfócitos CD4 Virgem, de Memória, de Memória Efetora e Efetores Diferenciados Pré e Pós o TMO. Valores absolutos (células/µl) de infócitos T virgem CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻ (A), linfócitos T de memória central CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ (B), linfócitos T de memória efetores CD4⁺CD27⁻CD45RO⁺ (C), e de linfócitos T efetores diferenciados CD4⁺CD27⁻CD45RO⁻ (D). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os círculos cheios indicam os valores outliers. Períodos analisados: Pré-transplante, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360 dias pós-transplante. ^aTeste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$.

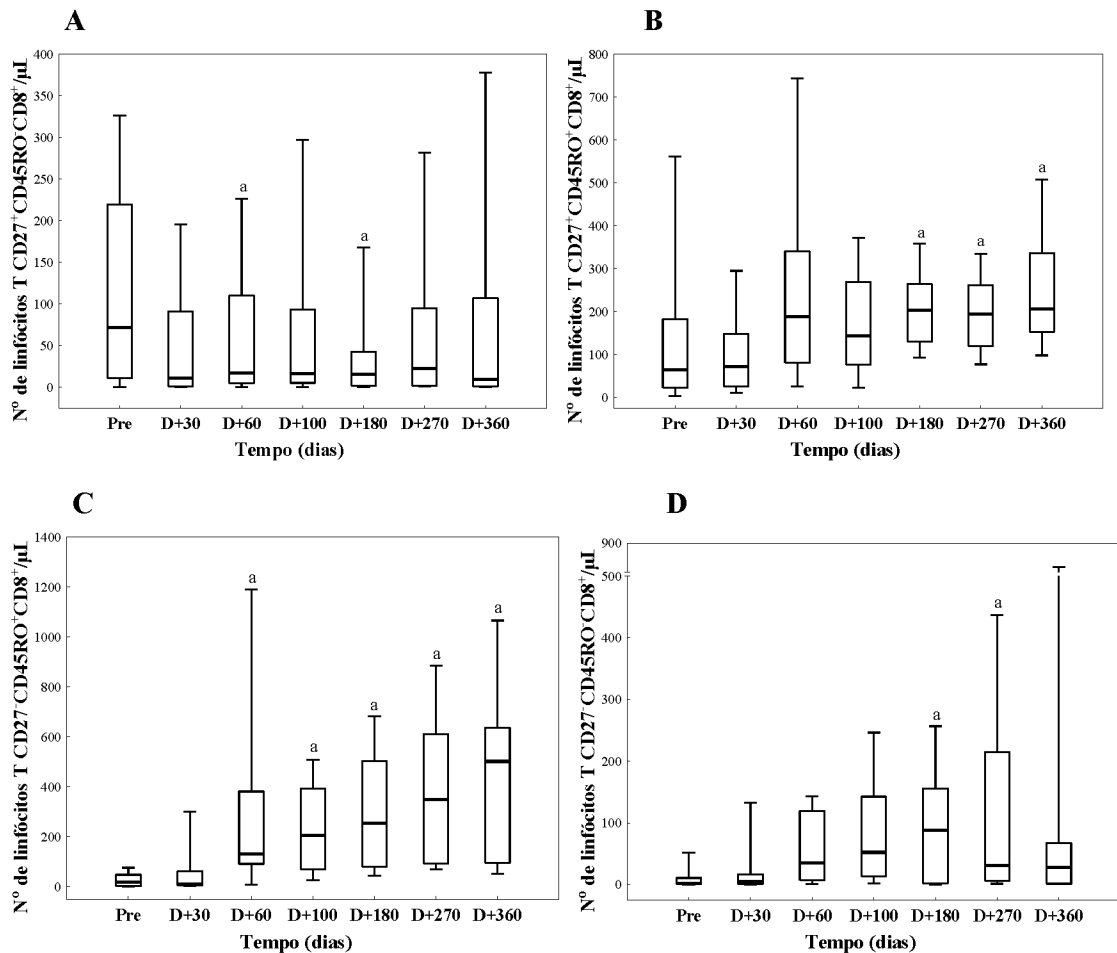


Figura 8 – Reconstituição de Linfócitos CD8 Virgem, de Memória, de Memória Efetora e Efetores Diferenciados Pré e Pós o TMO. Valores absolutos (células/ μ l) de infócitos T virgem $CD8^+CD27^+CD45RO^-$ (A), linfócitos T de memória central $CD8^+CD27^+CD45RO^+$ (B), linfócitos T de memória efetores $CD8^+CD27^-CD45RO^+$ (C), e de linfócitos T efetores diferenciados $CD8^+CD27^-CD45RO^-$ (D). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os círculos cheios indicam os valores outliers. Períodos analisados: Pré-transplante, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360 dias pós-transplante. ^a Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$.

O número de linfócito T virgem $CD4^+CD27^+CD45RO^-$ diminuiu significativamente nos pacientes nos seguimentos do D+30 ($p=0,005$), D+60 ($p < 0,001$) e D+100 ($P=0,002$). Esta população já se apresentava diminuída no período pré-tx em relação aos controles ($P < 0,001$) (Tabela 20) e mesmo após um ano, não atingiu os valores do grupo controle (Tabela 21).

Tabela 20 – Análise Comparativa Entre Controles e Pacientes Pré-tx Quanto ao Linfócito T Naive $CD27^+CD45RO^-CD4^+$

Variável/ μ L	Grupo	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
$27^+45RO^-4^+$	Controle	20,0	561,9	232,6	1612,4	$< 0,001$
	Paciente	23,0	99,7	3,2	2076,0	

Tabela 21 – Análise Comparativa Entre Controles e Pacientes Pós-tx Quanto ao Linfócito T Naive CD27⁺CD45RO⁻CD4⁺

Variável/ μ L	Grupo	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
27 ⁺ 45RO ⁻ 4 ⁺	Controle	20	561,9	232,6	1612,4	0,000
	Paciente	21	241,2	1,1	810,6	

Neste estudo, os pacientes não atingiram os valores do grupo controle para os linfócitos T CD27⁺CD45RO⁻CD4⁺ ($P=0,00$), porém para os linfócitos T CD27⁺CD45RO⁻CD8⁺ os valores aumentaram significativamente em relação ao grupo controle ($P=0,03$). As células T virgens CD27⁺CD45RO⁻CD4⁺ apresentaram uma tendência a aumentar nos pacientes a partir de seis meses após o TMO (Tabela 13). A Tabela 17 e Figura 7A mostram diminuição significativa dos linfócitos T CD8⁺ virgens após o transplante, nos dias D+60 ($p=0,016$) e D+180 ($P=0,030$).

Como podemos observar nas Figuras 8B e 8C que, após o transplante, ocorreu uma predominância de linfócitos T de memória central e efetor, bem como os linfócitos T efetores diferenciados, principalmente de linfócitos T CD8⁺ (Figura 8D). No período de trinta dias pós-tx o número linfócitos T CD8⁺ de memória central diminuiu, porém não foi significativo (Tabela 18), em seguida aumentou significativamente, em relação aos valores pré-tx, nos dias D+180 até D+360 (D+180 $P=0,049$, D+270 $P=0,008$ e D+360 $P=0,012$) (Figura 8B). Quanto aos linfócitos T CD4⁺ de memória efetora, também aumentaram até um ano pós-tx este aumento foi estatisticamente significativo nos períodos de D+60 a D+360 analisados (D+60 $p=0,01$; D+100 $P=0,001$; D+180 $P=0,002$; D+270 e D+360 $P<0,001$) (Tabela15, Figura 7C). Por outro lado, os linfócitos T CD4⁺ de memória central estavam discretamente diminuídos logo após o transplante e aumentou na sequência, com resultados sem significância, com exceção no D+30 (Tabela 14, Figura 7B). Vale notar que o número de linfócitos T CD4⁺ de memória efetores estava diminuído nos pacientes (pré-tx) quando comparado aos valores dos controles saudáveis ($P<0,001$) (Tabela 22). O número de linfócitos T CD8⁺ de memória efetores começou aumentar no D+60 pós-tx e apresentou um aumento estatisticamente significativo do D+60 ao D+360 pós-tx (D+60 $P=0,001$; D+100 ao D+360 $P<0,001$; (Tabela 18 Figura 7C).

Tabela 22 – Análise Comparativa das Células de Memória Efetoras – Controle vs pacientes (Amostra Pré-tx)

Variável/ μ L	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de P
27 ⁻ 45RO ⁺ 4 ⁺	Controle	20,0	112,9	99,6	27,0	334,0	72,8	<0,001
	Paciente	20,0	24,0	20,1	0,1	52,0	17,0	

De maneira semelhante, o número de linfócitos T $CD8^+CD27^-CD45RO^-$ efetores diferenciados aumentou após o TMO, porém o aumento foi significativo do D+180 e D+270 pós-tx (Tabela 19 Figura 8D). Os linfócitos T $CD4^+$ efetores diferenciados também mostraram aumento significativo a partir de seis meses (D+180) até o final deste estudo (Tabela 15 Figura 7D).

Um padrão semelhante de recuperação aos linfócitos T de memória efetora ($CD27^-CD45RO^+$) e efetora diferenciada ($CD27^-CD45RO^-$), tanto para linfócitos T $CD4^+$ quanto para linfócito T $CD8^+$ foi encontrado nos linfócitos T senescente/replicativo e nos linfócitos NKT. Por sua vez, os linfócitos T senescentes/replicativos, com fenótipo $CD57^+CD28^-CD4^+$ (Tabela 23) ou $CD57^+CD28^-CD8^+$ (Tabela 24) foram detectados em pequenas quantidades antes do transplante; no entanto estas células T efetoras em estágio tardio, foram detectadas no D+60 ($P=0,013$ para a população $CD4^+$ e $P=0,004$ para a população $CD8^+$), e lenta e progressivamente aumentaram, em particular os linfócitos T $CD8^+$ com fenótipo $CD57^+CD28^-$ (Tabela 25 Figura 9B).

Tabela 23 – Linfócitos T Senescentes/Replicativas $CD57^+CD28^-CD4^+$ / μ L

57+28-4+	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	16	0,3	0,1	0,0	1,5	0,5
D+30	20	0,1	0,0	0,0	0,9	0,3
D+60	19	1,8	1,2	0,0	10,3	2,6
D+100	20	1,6	0,9	0,0	4,7	1,5
D+180	19	4,1	2,0	0,0	26,1	6,2
D+270	21	9,7	3,0	0,0	56,6	15,6
D+360	21	24,3	4,2	0,0	276,4	61,3

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,463$; Pré x D+60, $P=0,013$; Pré x D+100, $P=0,009$; Pré x D+180, $P=0,003$; Pré x D+270, $P=0,006$; Pré x D+30, $P=0,002$.

Tabela 24 – Linfócitos T Senescentes/Replicativas $CD57^+CD28^-CD8^+$ / μ L

57+28-8+	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	16	9,9	7,1	0,0	37,0	10,0
D+30	20	22,0	7,2	0,0	202,5	45,8
D+60	19	76,7	47,4	0,3	288,6	79,1
D+100	20	121,0	55,8	0,4	454,4	146,4
D+180	19	180,8	126,9	1,9	650,7	194,5
D+270	21	230,6	142,2	1,9	795,0	239,2
D+360	21	457,8	97,9	7,7	4722,8	1044,6

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,865$; Pré x D+60, $P=0,004$; Pré x D+100, $P=0,003$; Pré x D+180, $P=0,002$; Pré x D+270, $P=0,001$; Pré x D+30, $P=0,001$.

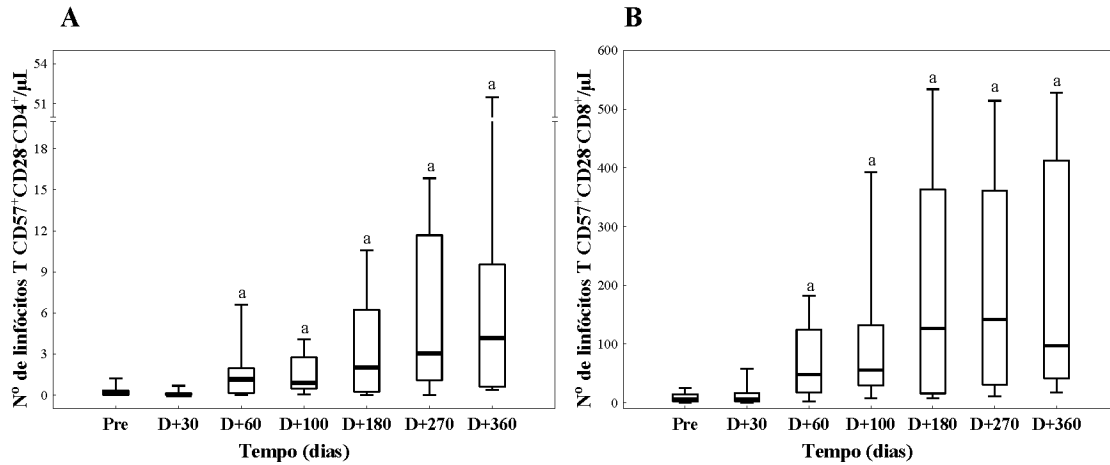


Figura 9 – Reconstituição de Linfócitos Senescentes/Replicativos, CD4⁺ e CD8⁺ Pré e Pós o TMO. Valores absolutos (células/µl) de infócitos T CD57⁺CD28⁻CD4⁺(A), linfócitos T CD57⁺CD28⁻CD8⁺ (B). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os círculos cheios indicam os valores outliers. Períodos analisados: Pré-transplante, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360 dias pós-transplante. ^a Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$.

A frequência das células CD57⁺CD28⁻CD4⁺ aumentou acentuadamente após o transplante (D+60 $P=0,013$; D+100 $P=0,009$; D+180 $P=0,003$ e D+270 $P=0,006$ e D+360 $P=0,002$) (Tabela 23, Figura 9A), assim como os linfócitos CD57⁺CD28⁻CD8⁺, que também aumentaram após o transplante (D+60 $P=0,004$; D+100 $P=0,003$; D+180 $P=0,002$ e D+270 e D+360 $P=0,001$) (Tabela 24, Figura 9B). Além disso, quando comparamos ao grupo controle, um ano após o TMO, o aumento foi significativo para as células CD57⁺CD28⁻CD8⁺, $P=0,00$ (Tabela 25). Para as células CD57⁺CD28⁻CD4⁺, houve aumento, porém não significativo ($P=0,345$).

Tabela 25 – Análise Comparativa dos Linfócitos T Recém-Emigrados do Timo – Controle vs Pacientes (Amostra Pré-tx)

Variável/µL	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de P
57 ⁺ 28 ⁻ 4 ⁺	Controle	20	5,2	2,6	0,0	23,6	6,9	0,345
	Paciente	21	24,3	4,2	0,0	276,4	61,3	
57 ⁺ 28 ⁻ 8 ⁺	Controle	20	30,7	22,6	0,3	103,2	24,2	0,000
	Paciente	21	457,8	97,9	7,7	4722,8	1044,6	

Foi avaliado também a reconstituição após o TMO dos linfócitos T CD4⁺ recém-emigrantes do timo. A Tabela 26 e a Figura 10A mostram que o número absoluto de células T CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺, diminuiu do D+30 ao D+100 ($P=0,006$ e $P=0,022$, respectivamente) após o transplante. No entanto, a partir do D+270 ($P=0,039$), o aumento foi significativo e uma tendência a aumentar até o final, sugerindo um aumento da produção tímica de células T virgemes nesses pacientes. Interessantemente, os linfócitos T CD8⁺CD45RA⁺CD31⁺, diminuíram significativamente do D+30 ao D+100 (D+30 $P=0,008$; D+60 $P=0,014$ e D+100 $P=0,036$). A partir do D+360 ($P=0,010$) esta população aumento significativamente ($P=0,010$) (Tabela 27, Figura 10B).

Como esperado, um perfil semelhante a essas células foi observado nos linfócitos T com fenótipo de células virgens, CD27⁺CD45RO⁻CD4⁺ ou CD8⁺ (Tabelas 12 e 16, Figuras 7A e 8A).

Tabela 26 – Linfócitos T recém emigrado do timo CD45RA⁺CD31⁺CD4⁺/μL

45RA⁺31⁺4⁺	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	20	154,8	85,3	2,0	914,0	211,1
D+30	23	33,5	5,2	0,2	291,6	65,5
D+60	22	23,4	15,4	0,7	108,2	28,3
D+100	22	54,7	14,3	0,2	426,1	107,6
D+180	21	72,1	45,6	0,5	384,8	88,1
D+270	21	182,6	155,5	0,6	793,8	183,2
D+360	20	232,0	224,4	2,2	796,9	190,7

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,006$; Pré x D+60, $P=0,001$; Pré x D+100, $P=0,022$; Pré x D+180, $P=0,295$; Pré x D+270, $P=0,039$; Pré x D+30, $P=0,002$.

Tabela 27 – Linfócitos T naive CD45RA⁺CD31⁺CD8⁺/μL

45RA⁺31⁺8⁺	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	20	283,5	220,0	1,3	1285,2	310,6
D+30	23	86,8	20,0	0,0	437,4	133,4
D+60	22	258,0	103,2	2,1	3200,8	665,2
D+100	22	188,8	111,7	3,9	829,3	211,8
D+180	21	271,3	166,6	10,0	837,7	254,7
D+270	21	396,4	272,2	21,4	1515,3	366,4
D+360	20	632,5	449,1	98,9	4518,6	960,8

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,008$; Pré x D+60, $P=0,014$; Pré x D+100, $P=0,036$; Pré x D+180, $P=0,841$; Pré x D+270, $P=0,094$; Pré x D+30, $P=0,010$.

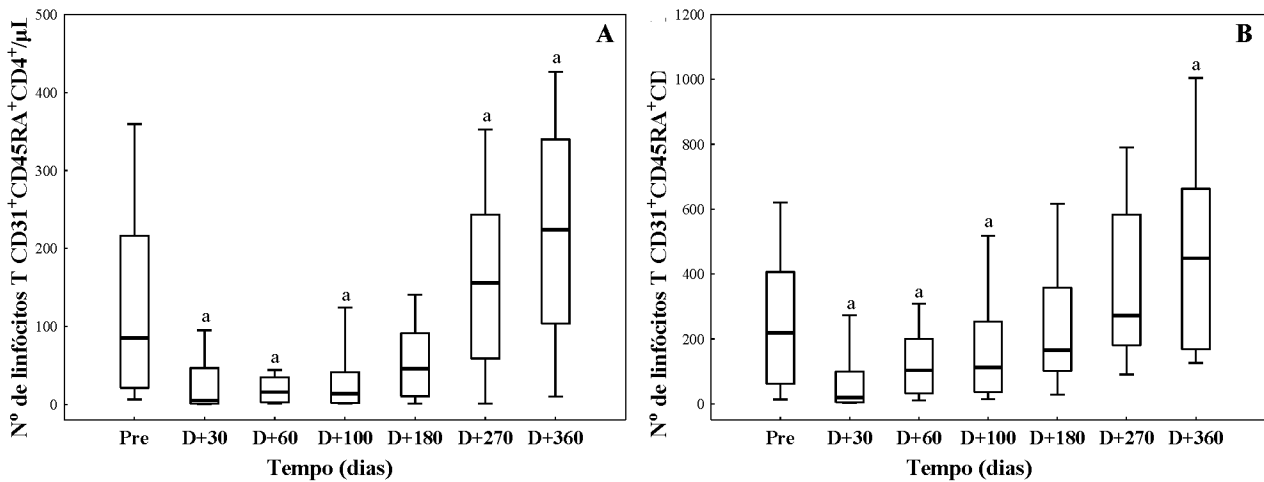


Figura 10 – Reconstituição de Linfócitos Recém-Emigrados do Timo, CD45RA⁺CD31⁺CD4⁺ ou CD8⁺ Pré e Pós o TMO. Valores absolutos (células/ μ L) de linfócitos T CD45RA⁺CD31⁺CD4⁺ (A), linfócitos T CD45RA⁺CD31⁺CD8⁺ (B). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os círculos cheios indicam os valores outliers. Períodos analisados: Pré-transplante, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360 dias pós-transplante. ^a Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$.

4.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE APOPTOSE CD95 E CD95L NOS LINFÓCITOS T E B

Avaliamos também alguns marcadores imunológicos envolvidos na ativação celular e sinalização da apoptose (CD95/Fas, CD178/FasL e CD69) nos linfócitos T e B. A frequência de linfócitos T CD3⁺ que expressaram CD95 aumentaram a partir do D+60 pós-tx, embora o aumento destas células não tenha sido significativo (Tabela 28).

Tabela 28 – Linfócitos T CD95⁺CD3⁺/ μ L

95 ⁺ 3 ⁺	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	20	68,9	67,5	0,5	190,6	50,7
D+30	22	59,7	40,9	0,7	265,0	68,6
D+60	21	130,9	93,2	5,6	789,0	167,7
D+100	22	82,4	73,1	2,9	199,7	58,9
D+180	21	124,6	80,7	23,0	688,9	148,0
D+270	21	86,7	74,1	11,8	281,4	63,7
D+360	21	117,7	93,0	15,9	314,9	81,1

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,445$; Pré x D+60, $P=0,170$; Pré x D+100, $P=0,601$; Pré x D+180, $P=0,376$; Pré x D+270, $P=0,215$; Pré x D+30, $P=0,094$.

A Tabela 29 mostra que frequência de linfócitos B CD19⁺CD95⁺ após o TMO, retornaram aos níveis basais nove meses pós-tx no D+60, entretanto estas diferenças não foram significantes ($P>0,05$), apenas no D+30 houve uma queda importante ($P=0,004$). A porcentagem de linfócitos T CD3⁺ que expressam o ligante de FasL (ou CD178) também aumentou significativamente em relação à porcentagem de células pré-tx em um dos períodos analisados (D+270 $P=0,002$) porém o aumento na frequência destas células não foi estatisticamente significativo, nos demais período (Tabela 30). Quanto aos linfócitos B, o aumento foi significativo a partir do D+180 (D+180 $P=0,041$; D+270 $P=0,006$ e D+360 $P=0,033$) (Figura 31). Esse aumento da frequência de células T e B Fas⁺ durante vários meses após o transplante nesses pacientes sugere um aumento da suscetibilidade a apoptose mediada por Fas/FasL.

Tabela 29 – Linfócitos T CD95⁺CD19⁺/μL

95+19+	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	19	32,1	2,5	0,0	528,3	120,3
D+30	20	0,8	0,4	0,0	3,4	1,1
D+60	21	3,2	1,6	0,0	20,8	4,7
D+100	22	2,7	2,0	0,0	8,5	2,4
D+180	20	7,3	2,9	0,0	60,0	13,5
D+270	21	4,2	4,0	0,0	11,4	3,4
D+360	21	6,8	5,4	0,0	36,1	7,6

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,004$; Pré x D+60, $P=0,427$; Pré x D+100, $P=0,184$; Pré x D+180, $P=0,266$; Pré x D+270, $P=0,196$; Pré x D+30, $P=0,149$.

Tabela 30 – Linfócitos T CD178⁺CD3⁺/μL

178+3⁺	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	15	13,5	6,8	0,0	75,9	18,7
D+30	17	22,8	4,8	0,0	153,9	40,5
D+60	17	71,0	10,6	0,0	385,6	122,1
D+100	20	37,6	22,5	0,0	182,4	50,9
D+180	20	33,0	16,2	0,0	136,9	39,8
D+270	20	122,3	36,1	2,5	1153,1	267,3
D+360	21	95,2	22,4	0,0	492,6	138,6

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,925$; Pré x D+60, $P=0,196$; Pré x D+100, $P=0,056$; Pré x D+180, $P=0,064$; Pré x D+270, $P=0,002$; Pré x D+30, $P=0,056$.

Tabela 31 – Linfócitos T CD178⁺CD19⁺/μL

178/19	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	14	3,4	1,5	0,0	13,1	4,1
D+30	15	1,1	0,5	0,0	4,5	1,3
D+60	17	9,4	2,0	0,1	124,7	29,8
D+100	20	7,5	2,0	0,0	52,6	15,2
D+180	19	6,1	2,4	0,1	50,6	11,8
D+270	20	10,7	7,9	0,0	64,5	14,5
D+360	21	11,8	4,8	0,0	102,5	22,5

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,131$; Pré x D+60, $P=0,875$; Pré x D+100, $P=0,600$; Pré x D+180, $P=0,041$; Pré x D+270, $P=0,006$; Pré x D+30, $P=0,033$.

As células que expressaram o marcador CD69, marcador de ativação precoce, permaneceram praticamente inalteradas para os linfócitos T, após o transplante, com exceção do D+100 quando houve diminuição ($P=0,002$), como mostra a Tabela 32. Quanto às células CD69⁺CD19⁺ dobraram os níveis a partir do +30 e continuaram aumentando significativamente até o final do seguimento, no D+100, $P=0,012$; D+180, $P=0,009$; D+270, $P=0,015$ e D+360, $P=0,005$ (Tabela 33).

Tabela 32 – Linfócitos T CD69⁺CD3⁺/μL

69+3+	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	17	35,4	37,5	1,1	95,0	27,0
D+30	20	21,3	10,0	0,3	96,6	27,9
D+60	18	56,3	15,9	0,0	491,3	114,0
D+100	21	16,2	8,8	0,7	47,3	14,6
D+180	18	32,3	20,7	5,8	84,4	28,6
D+270	18	23,5	21,4	2,1	65,3	20,1
D+360	18	28,1	16,9	2,5	156,0	37,0

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,278$; Pré x D+60, $P=0,975$; Pré x D+100, $P=0,020$; Pré x D+180, $P=0,552$; Pré x D+270, $P=0,388$; Pré x D+30, $P=0,182$.

Tabela 33 – Linfócitos T CD69⁺CD19⁺/μL

69+3-	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	17	16,4	14,4	0,4	55,4	15,6
D+30	20	48,2	21,4	0,5	261,5	68,0
D+60	18	47,2	24,9	0,0	202,8	55,2
D+100	21	45,7	34,7	0,7	101,2	30,2
D+180	18	67,5	49,0	2,7	468,3	104,3
D+270	18	52,9	53,0	0,3	181,4	45,4
D+360	18	77,7	39,5	8,9	315,4	78,6

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,088$; Pré x D+60, $P=0,198$; Pré x D+100, $P=0,012$; Pré x D+180, $P=0,009$; Pré x D+270, $P=0,015$; Pré x D+30, $P=0,005$.

Neste estudo, foram analisados o valor absoluto das células T reguladoras (Treg) de fenótipo CD4⁺CD25^{fo}CD127^{fr}FOXP3⁺ e/ou CD4⁺CD25^{fo}GITR⁺FOXP3⁺. Estas células começaram a recuperar após o transplante no D+60 e aumentaram significativamente, dobrando os valores pré-transplante no D+270 tanto para as células marcadas com CD127 (Tabela 34, Figura 11) quanto GITR (Tabela 35).

Tabela 34 – Linfócitos Treg CD25^{fo}CD127^{fr}FoxP3⁺/μL

25^{fo}127^{fr}FOXP3⁺	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	20	6,8	4,0	0,3	28,6	7,5
D+30	23	5,6	2,4	0,0	47,9	10,5
D+60	22	6,2	3,9	0,1	20,4	5,4
D+100	22	9,2	6,5	0,7	30,1	8,8
D+180	21	7,5	6,5	1,4	27,5	6,3
D+270	21	13,6	,1	2,1	54,2	13,4
D+360	21	12,2	8,6	1,0	37,7	10,7

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,117$; Pré x D+60, $P=0,629$; Pré x D+100, $P=0,314$; Pré x D+180, $P=0,295$; Pré x D+270, $P=0,007$; Pré x D+30, $P=0,043$.

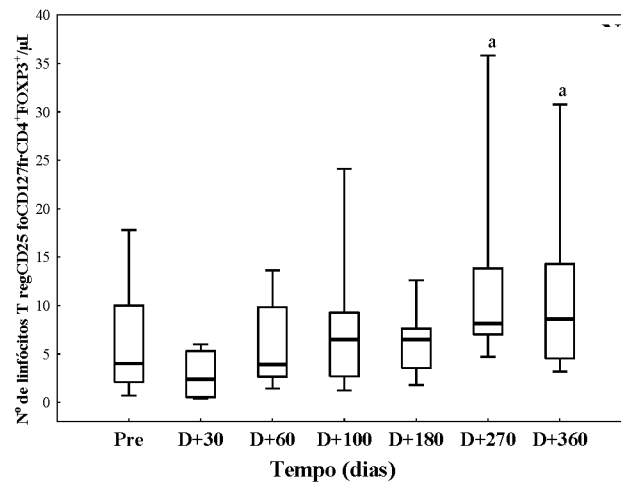


Figura 11 – Reconstituição de Linfócitos T Reguladores, CD25^{lo}CD127^{fr}CD4⁺ ou CD8⁺ Pré e Pós o TMO. Valores absolutos (células/ μ L) de infócitos T CD45RA⁺CD31⁺CD4⁺ (A). As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os círculos cheios indicam os valores outliers. Períodos analisados: Pré-transplante. D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360 dias pós-transplante. ^a Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$

Tabela 35 – Linfócitos Treg CD25^{lo}GITR⁺FoxP3⁺/ μ L

25 ⁺⁺ GITR+FOXP3+	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PRÉ	16	3,2	2,1	0,8	9,6	2,5
D+30	21	3,7	2,2	0,1	21,5	4,8
D+60	21	5,0	4,0	0,5	21,1	4,4
D+100	20	5,6	3,8	0,8	25,0	5,3
D+180	20	6,4	4,7	0,4	27,5	6,2
D+270	21	8,4	6,3	1,6	23,2	6,1
D+360	21	9,1	6,0	1,0	36,2	8,5

Momentos comparados: Pré x D+30, $P=0,925$; Pré x D+60, $P=0,301$; Pré x D+100, $P=0,214$; Pré x D+180, $P=0,427$; Pré x D+270, $P=0,011$; Pré x D+360, $P=0,049$.

A recuperação mais rápida do número de células Tregs acima descritas sugere que após o TMO ocorra uma expansão homeostática preferencial dessas células, dentro da população de células T CD4⁺ totais, durante a fase linfopênica da reconstituição imunológica.

4.3 AVALIAÇÃO NO SANGUE PERIFÉRICO DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DO GRUPO CONTROLE

4.3.1 Celularidade do Grupo Controle

Com o objetivo de analisar o perfil do grupo controle, foram avaliados valores absolutos dos leucócitos totais, linfócitos, monócitos e neutrófilos obtidos pela contagem hematológica realizada em contador automático.

As Tabela 36, 37 e 38 e a Figura 12 demonstram a comparação entre os grupos controle *vs* paciente antes do TMO e após um ano, a fim de observar se o paciente atinge os níveis da normalidade das diferentes células estudadas. Nas tabelas abaixo são apresentadas as medidas descritivas das variáveis (marcadores) do grupo controle.

Tabela 36 – Dados Referentes ao Grupo Controle

Variável/ μL	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Idade	20	7,65	7,50	1,00	15,00	4,34
Leucócitos	20	7350,00	7090,00	4840,00	11340,00	1750,96
Linfócitos	20	2944,85	2858,82	1354,66	6263,90	1162,97
Monócitos	20	430,28	446,62	28,53	704,50	218,85
Eosinófilos	20	285,11	282,12	68,25	627,24	170,81
Neutrófilos	20	3560,94	3490,49	1395,37	6913,99	1472,96
CD3 ⁺	20	2097,06	1920,01	987,95	4293,35	831,80
CD3 ⁺ CD4 ⁺	20	1174,65	1007,22	515,45	2446,72	498,03
CD3 ⁺ CD8 ⁺⁺	20	716,75	665,12	352,34	1520,90	333,03
CD4 ⁺ CD8 ⁺	20	3,68	2,58	1,40	13,43	3,11
CD4 ⁺ CD8 ⁻	20	145,03	132,23	62,72	353,17	70,17
CD45RA ⁺ CD31 ⁺ CD4 ⁺	20	673,54	559,84	220,72	1623,00	406,27
CD45RA ⁺ CD31 ⁺ CD8 ⁺	20	504,88	484,09	14,34	1051,10	239,75
TCR $\alpha\beta$ ⁺	20	2995,95	1641,36	925,10	24031,12	5013,42
TCR $\gamma\delta$ ⁺	20	144,24	132,23	57,25	353,17	71,10
Variável	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
CD69 ⁺ CD3 ⁺	20	22,04	16,21	3,71	87,27	20,97
CD69 ⁺ CD19 ⁺	20	136,64	128,49	68,38	239,96	50,91
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	20	233,34	183,16	20,86	732,61	188,94
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	20	316,89	279,51	151,45	605,92	133,43
CD24 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺	20	65,38	47,08	13,83	380,85	79,42
CD19 ⁺	20	511,65	401,46	215,39	1500,85	299,54
CD19 ⁺ CD20 ⁺	20	511,39	401,46	215,39	1500,85	299,54
CD19 ⁺ CD10 ⁺	20	141,95	49,18	17,68	782,78	200,13
CD27 ⁺ CD45RO ⁻ CD4 ⁺	20	674,80	561,88	232,58	1612,35	418,10
CD27 ⁺ CD45RO ⁺ CD4 ⁺	20	344,27	306,95	126,38	645,19	153,94
CD27 ⁻ CD45RO ⁺ CD4 ⁺	20	112,88	99,62	27,03	334,01	72,76
CD27 ⁻ CD45RO ⁻ CD4 ⁺	20	19,59	7,72	1,13	139,10	31,91

CD27+CD45RO-CD8+	20	2,62	1,01	0,00	21,30	4,75
CD27+CD45RO+CD8+	20	507,32	397,62	15,63	1296,65	320,29
CD27-CD45RO+CD8+	20	152,04	114,51	3,90	400,01	125,82
Variável	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
CD57+CD28-CD4+	20	5,19	2,62	0,00	23,60	6,87
CD57+CD28-CD8+	20	30,69	22,61	0,30	103,22	24,21
CD95+CD19+	20	6,34	4,99	2,33	19,44	4,16
CD95+CD3+	20	107,73	95,87	7,87	192,57	59,83
CD178+CD19+	20	15,60	8,14	0,00	125,12	26,83
CD178+CD3+	20	27,37	21,94	3,95	104,09	27,74
CD25 ^{fo} CD127 ^{fr} FOXP3+	20	19,05	17,65	2,41	48,87	11,25
CD25 ^{fo} GITR++FOXP3+	20	16,58	14,87	2,71	38,90	9,68

4.3.2 Comparação Entre Controles e Pacientes na Avaliação Pré-tx

Avaliamos também 20 amostras de sangue periférico em um grupo controle. Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais para controles e pacientes, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Nas tabelas abaixo são apresentadas as medidas descritivas das variáveis (marcadores) de acordo com o grupo (controle ou paciente) e os valores de P dos testes estatísticos.

Tabela 37 – Estudo Comparativo – Pacientes Pré-tx vs Grupo Controle

Variável/ μ L	Grupo	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
Linfócitos	Controle	20,0	2858,8	1354,7	6263,9	
	Paciente	20,0	886,0	28,8	6455,1	<0,001 ^a
Monócitos	Controle	20,0	446,6	28,5	704,5	
	Paciente	20,0	93,3	0,5	441,2	<0,001 ^a
Eosinófilos	Controle	20,0	282,1	68,3	627,2	
	Paciente	20,0	3,5	0,0	44,5	<0,001 ^a
Neutrófilos	Controle	20,0	3490,5	1395,4	6914,0	
	Paciente	20,0	1540,9	281,1	3389,6	<0,001 ^b

CD3+	Controle	20,0	1920,0	988,0	4293,4	<0,001
	Paciente	20,0	674,2	14,9	4571,5	
CD3+CD4+	Controle	20,0	1007,2	515,5	2446,7	<0,001
	Paciente	20,0	272,6	7,2	2474,2	
CD3+CD8+	Controle	20,0	665,1	352,3	1520,9	0,001
	Paciente	20,0	321,4	7,3	1817,1	
CD4-CD8-	Controle	20,0	132,2	62,7	353,2	<0,001
	Paciente	20,0	39,5	0,1	170,2	
CD45RA+31+4+	Controle	20,0	559,8	220,7	1623,0	<0,001
	Paciente	20,0	85,3	2,0	914,0	
CD45RA+31+8+	Controle	20,0	484,1	14,3	1051,1	0,003
	Paciente	20,0	220,0	1,3	1285,2	
TCR $\alpha\beta$ +	Controle	20,0	1641,4	925,1	24031,1	<0,001
	Paciente	20,0	627,7	14,6	4403,7	
TCR $\gamma\delta$ +	Controle	20,0	132,2	57,3	353,2	<0,001
	Paciente	20,0	37,0	0,2	170,2	
CD69+CD3+	Controle	20,0	16,2	3,7	87,3	0,110
	Paciente	17,0	37,5	1,1	95,0	
CD69+CD19+	Controle	20,0	128,5	68,4	240,0	<0,001
	Paciente	17,0	14,4	0,4	55,4	
CD3+CD16+56+	Controle	20,0	183,2	20,9	732,6	<0,001
	Paciente	20,0	52,5	1,0	165,3	
CD3-CD16+56+	Controle	20,0	279,5	151,5	605,9	<0,001
	Paciente	20,0	65,2	1,0	544,7	
CD19+	Controle	20,0	401,5	215,4	1500,9	<0,001
	Paciente	20,0	79,5	0,7	1758,4	
CD19+CD20+	Controle	20,0	401,5	215,4	1500,9	<0,001
	Paciente	20,0	75,0	0,7	1621,5	
CD19+CD10+	Controle	20,0	49,2	17,7	782,8	<0,001
	Paciente	20,0	0,7	0,0	36,9	
CD27+45RO-4+	Controle	20,0	561,9	232,6	1612,4	<0,001
	Paciente	20,0	99,7	3,2	2076,0	
CD27+45RO+4+	Controle	20,0	307,0	126,4	645,2	<0,001
	Paciente	20,0	114,4	1,5	625,1	
CD27-45RO+4+	Controle	20,0	99,6	27,0	334,0	<0,001
	Paciente	20,0	20,1	0,1	52,0	
CD27-45RO-4+	Controle	20,0	7,7	1,1	139,1	<0,001
	Paciente	20,0	0,8	0,0	15,2	
CD27+45RO-8+	Controle	20,0	0,0	21,3	4,7	<0,001
	Paciente	20,0	0,0	389,7	129,2	
CD27+45RO+8+	Controle	20,0	15,6	1296,7	320,3	<0,001
	Paciente	20,0	1,1	1584,7	370,9	
CD27-45RO+8+	Controle	20,0	3,9	400,0	125,8	

	Paciente	20,0	0,0	232,4	53,1	<0,001
CD27-45RO-8+	Controle	20,0	0,0	16,9	4,4	
	Paciente	20,0	0,0	452,8	100,6	0,461
CD57+28-4+	Controle	20,0	2,6	0,0	23,6	<0,001
	Paciente	16,0	0,1	0,0	1,5	
CD57+28-8+	Controle	20,0	22,6	0,3	103,2	0,001
	Paciente	16,0	7,1	0,0	37,0	
CD95+CD19+	Controle	20,0	5,0	2,3	19,4	0,057
	Paciente	19,0	2,5	0,0	528,3	
CD95+CD3+	Controle	20,0	95,9	7,9	192,6	0,046
	Paciente	20,0	67,5	0,5	190,6	
CD178+CD19+	Controle	20,0	8,1	0,0	125,1	0,002
	Paciente	14,0	1,5	0,0	13,1	
CD178+CD3+	Controle	20,0	21,9	4,0	104,1	0,012
	Paciente	15,0	6,8	0,0	75,9	
CD25 ^{fo} 127 ^{fr} FOXP3 ⁺	Controle	20,0	17,6	2,4	48,9	<0,001
	Paciente	20,0	4,0	0,3	28,6	
CD25 ^{fo} GITR+FOX P3 ⁺	Controle	20,0	14,9	2,7	38,9	<0,001
	Paciente	16,0	2,1	0,8	9,6	

fo= forte ; fr= fraco. ^a Teste t de Student para amostras independentes, $P<0,05$ ^b Teste de Mann-Whitney, $P<0,05$.

Como observado na Tabela 37, antes do transplante os pacientes mostravam valores muito abaixo, aproximadamente 50%, quando comparado ao grupo controle. A análise estatística foi significativa para a maioria das células analisadas ($P<0,05$), com exceção para as populações CD69⁺CD3⁺ e CD95⁺CD19⁺ ($P=0,110$ e $P=0,057$, respectivamente).

4.3.3 Comparação entre Controles e Pacientes na Avaliação Pós-tx

Após um ano do transplante a maioria das células atingiu a normalidade como observado na Tabela 38; neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos. Porém alguns subtipos de linfócitos, como os linfócitos T auxiliares (LTCD4⁺), os linfócitos T duplo negativos/TCR $\gamma\delta$ ⁺ (LTCD4-CD8⁻), os linfócitos naives recém-emigrados do timo, linfócitos B, linfócitos B ativados, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ naive e de memória, linfócitos T CD8⁺ senescentes e os linfócitos T reguladores não atingiram a normalidade. Para esta análise

testamos para cada um dos marcadores, a hipótese nula de que os resultados são iguais para controles e pacientes, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela abaixo são apresentadas as medidas descritivas das variáveis (marcadores) de acordo com o grupo controle e os valores de *P* dos testes estatísticos.

Tabela 38 – Estudo Comparativo – Pacientes Pós-tx vs Grupo Controle

Variável/ μL	Grupo	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
Linfócitos	Controle	20	2858,8	1354,7	6263,9	0,519 ^a
	Pacientes	21	1890,0	970,0	10802	
Monocitos	Controle	20	446,6	28,5	704,5	0,637 ^a
	Pacientes	21	440,3	115,2	1352	
Eosinófilos	Controle	20	282,1	68,3	627,2	0,615 ^a
	Pacientes	21	196,2	30,5	1105	
Neutrófilos	Controle	20	3490,5	1395,4	6914,0	0,238 ^b
	Pacientes	21	2800,2	1614,1	17460	
CD3+	Controle	20	1920,0	988,0	4293,4	0,199
	Paciente	21	1487,7	469,8	10111,0	
CD3+CD4+	Controle	20	1007,2	515,5	2446,7	0,000
	Paciente	21	567,0	16,3	1248,1	
CD3+CD8+	Controle	20	665,1	352,3	1520,9	0,544
	Paciente	21	876,8	72,4	8813,6	
CD4+CD8+	Controle	20	2,6	1,4	13,4	0,786
	Paciente	21	3,1	0,1	25,9	
CD4-CD8-	Controle	20	132,2	62,7	353,2	0,000
	Paciente	21	66,1	3,6	241,9	
CD45RA+31+4+	Controle	20	559,8	220,7	1623,0	0,000
	Paciente	20	224,4	2,2	796,9	
CD45RA+31+8+	Controle	20	484,1	14,3	1051,1	0,445
	Paciente	20	449,1	98,9	4518,6	
TCR $\alpha\beta$ +	Controle	20	1641,4	925,1	24031,1	0,282
	Paciente	21	1429,2	433,4	10039,7	
TCR $\gamma\delta$ +	Controle	20	132,2	57,3	353,2	0,005
	Paciente	21	76,1	34,6	241,9	
CD69+CD3+	Controle	20	16,2	3,7	87,3	0,874
	Paciente	18	16,9	2,5	156,0	
CD69+CD19+	Controle	20	128,5	68,4	240,0	0,001
	Paciente	18	39,5	8,9	315,4	
CD3+CD16+56+	Controle	20	183,2	20,9	732,6	0,045
	Paciente	21	107,6	27,2	1406,5	
CD3-CD16+56+	Controle	20	279,5	151,5	605,9	0,030
	Paciente	21	173,5	77,4	684,2	
CD19+	Controle	20	401,5	215,4	1500,9	0,001
	Paciente	21	237,9	42,1	1023,3	

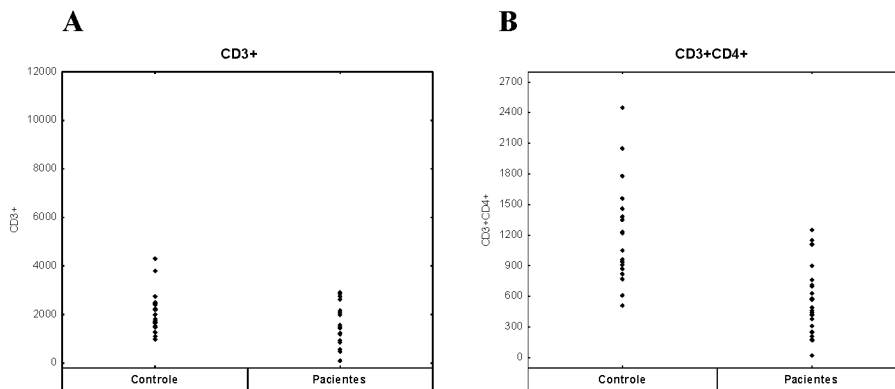
CD19+CD20+	Controle	20	401,5	215,4	1500,9	
	Paciente	21	233,2	29,2	992,9	0,001
CD19+CD10+	Controle	20	49,2	17,7	782,8	
	Paciente	21	15,6	0,6	81,0	0,000
CD27+45RO-4+	Controle	20	561,9	232,6	1612,4	
	Paciente	21	241,2	1,1	810,6	0,000
CD27+45RO+4+	Controle	20	307,0	126,4	645,2	
	Paciente	21	162,6	83,2	311,1	0,001
CD27-45RO+4+	Controle	20	99,6	27,0	334,0	
	Paciente	21	99,4	10,3	830,7	0,867
CD27-45RO-4+	Controle	20	7,7	1,1	139,1	
	Paciente	21	7,4	0,6	65,9	0,728
CD27+45RO-8+	Controle	20	1,0	0,0	21,3	
	Paciente	21	9,7	0,0	474,4	0,003
CD27+45RO+8+	Controle	20	397,6	15,6	1296,7	
	Paciente	21	206,1	7,4	622,0	0,001
CD27-45RO+8+	Controle	20	114,5	3,9	400,0	
	Paciente	21	501,0	17,7	6895,1	0,005
CD27-45RO-8+	Controle	20	0,9	0,0	16,9	
	Paciente	21	27,4	0,3	1556,6	0,001
CD57+CD28-4+	Controle	20	2,6	0,0	23,6	
	Paciente	21	4,2	0,0	276,4	0,345
CD57+CD28-8+	Controle	20	22,6	0,3	103,2	
	Paciente	21	97,9	7,7	4722,8	0,000
CD95+CD19+	Controle	20	5,0	2,3	19,4	
	Paciente	21	5,4	0,0	36,1	0,689
CD95+CD3+	Controle	20	95,9	7,9	192,6	
	Paciente	21	93,0	15,9	314,9	0,969
CD178+CD19+	Controle	20	8,1	0,0	125,1	
	Paciente	21	4,8	0,0	102,5	0,098
CD178+CD3+	Controle	20	21,9	4,0	104,1	
	Paciente	21	22,4	0,0	492,6	0,477
25 ^{fo} 127 ^{fr} FOXP3+	Controle	20	17,6	2,4	48,9	
	Paciente	21	8,6	1,0	37,7	0,025
25 ^{fo} GITR++FOXP3+	Controle	20	14,9	2,7	38,9	
	Paciente	21	6,0	1,0	36,2	0,004

^{fo}= forte ; ^{fr}= fraco. ^a Teste t de Student para amostras independentes, $P<0,05$. ^b Teste de Mann-Whitney, $P<0,05$.

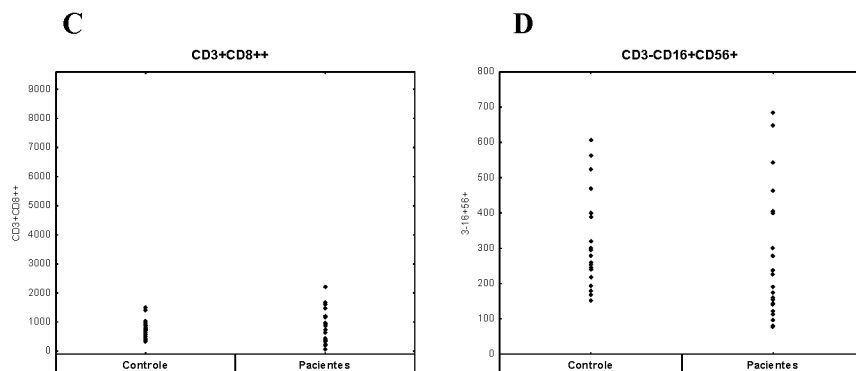
A Tabela 38 mostra análise comparativa entre os pacientes no D+360 com os controles, a fim de avaliar se os pacientes conseguiram atingir os níveis celulares semelhantes aos valores dos controles. Após um ano do transplante os linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos alcançaram os valores do grupo controle. Quando analisamos as subpopulações

linfocitárias, várias não atingiram os valores do grupo controle, como segue: Linfócito T auxiliar $CD3^+CD4^+$ ($P=0,00$), Linfócito T duplo negativo $CD3^+CD4^-CD8^-$ ($P=0,00$), Linfócito T recém-emigrado do timo $CD45RA^+CD31^+CD4^+$ ($P=0,00$), $TCR\gamma\delta^+$ ($P=0,005$), Linfócito B ativado $CD69^+CD19^+$ ($P=0,001$), Linfócito NK $CD3^-CD16^+CD56^+$ ($P=0,030$), $CD19^+$ ($P=0,001$), Linfócito B maduro $CD19^+CD20^+$ ($P=0,001$), Linfócito B imaturo $CD19^+CD10^+$ ($P=0,00$), Linfócito T $CD4^+$ naíve $CD27^+CD45RO^-CD4^+$ ($P=0,00$), Linfócito T $CD4^+$ memória $CD27^+CD45RO^+CD4^+$ ($P=0,001$), Linfócito Treg $CD25^{fo}CD127^{fr}FOXP3^+CD4^+$ ($P=0,025$) e $CD25^{fo}GITR^+FOXP3^+CD4^+$ ($P=0,004$). Algumas células mostraram um aumento muito significativo quando comparamos ao controle; Linfócito T naíve $CD27^+CD45RO^-CD8^+$ ($P=0,003$), Linfócito T memória $CD27^+CD45RO^+CD8^+$ ($P=0,001$), Linfócito T efetor $CD27^-CD45RO^+CD8^+$ ($P=0,005$), Linfócito T efetor diferenciado $CD27^-CD45RO^-CD8^+$ ($P=0,001$) e Linfócito T senescente $CD57^+CD28^-CD8^+$ ($p=0,00$).

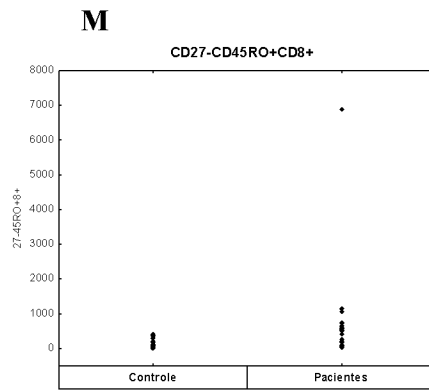
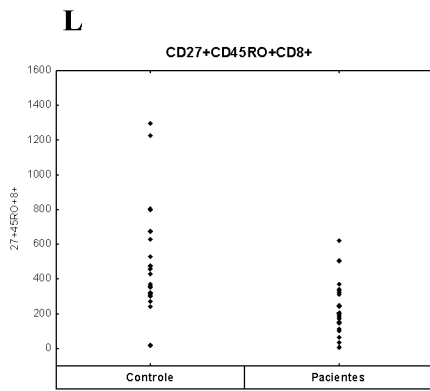
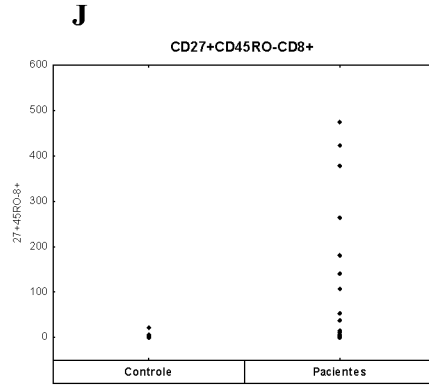
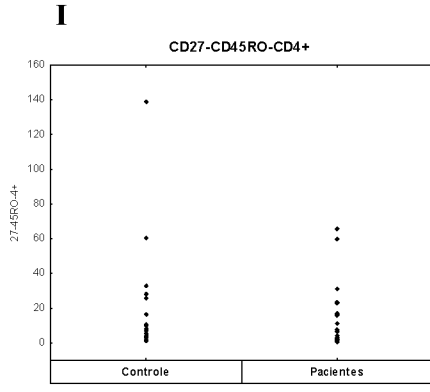
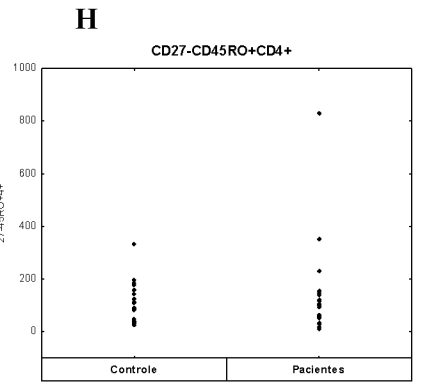
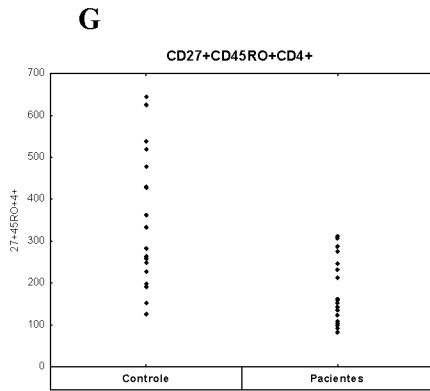
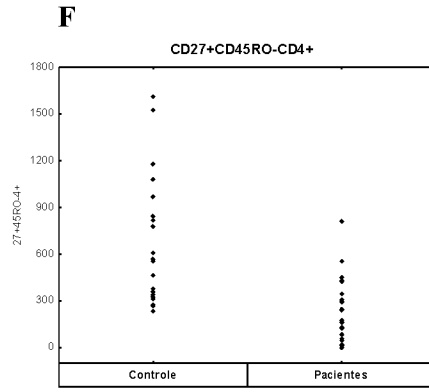
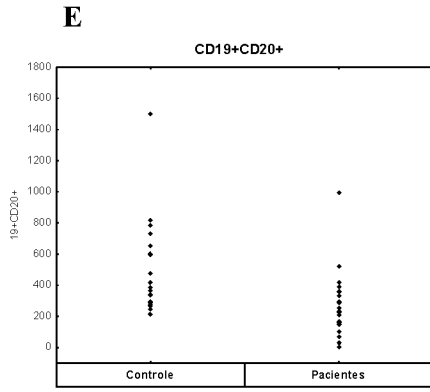
Podemos observar nas Figuras algumas comparações descritas acima (pacientes no D+360 vs controles).



Outlier: paciente 22



Outlier: paciente 22



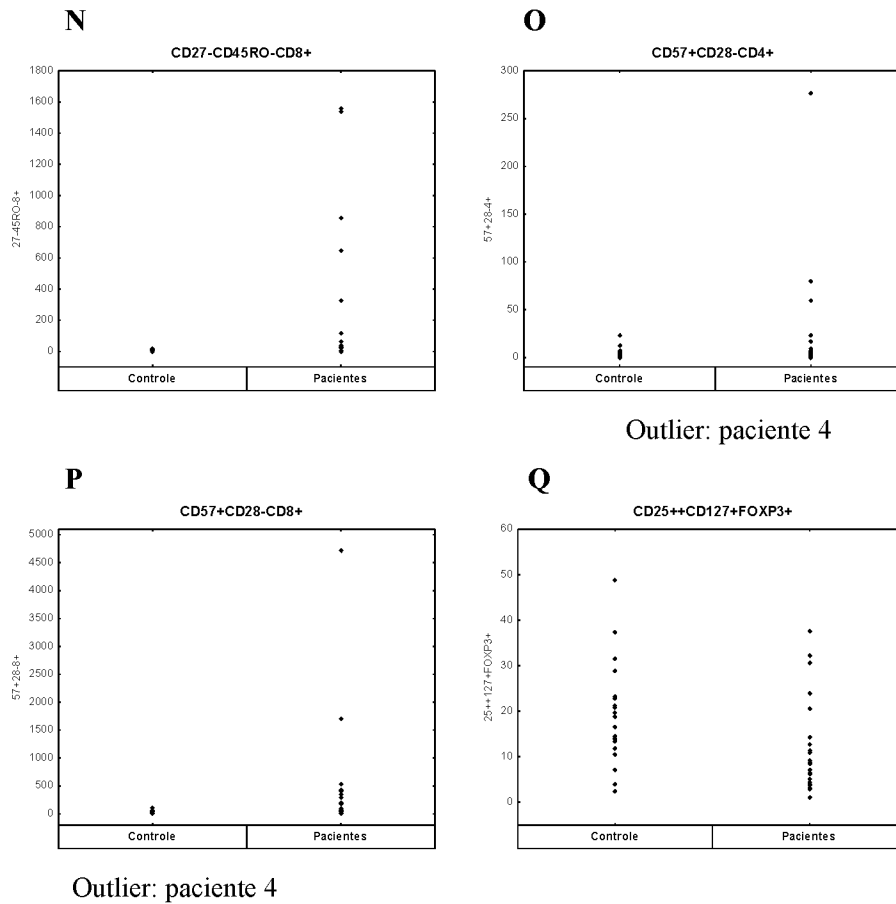


Figura 12 – Expressão dos Marcadores: CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD28, CD31, CD45RA, CD45RO, CD57, CD127, FOXP3, GITR nos linfócitos em sangue periférico dos pacientes com AF no D+360 do TMO e do grupo controle (Valores absolutos). Os círculos cheios para a da mediana indicam os valores outliers.

4.4 RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA EM PACIENTES COM AF QUE RECEBERAM MEDULA ÓSSEA DE DOADOR RELACIONADO E NÃO RELACIONADO

Com o objetivo de investigar a resposta imune dos pacientes com AF que receberam MO de doador relacionado e não relacionado, foram agrupados os pacientes de acordo com o tipo de doador. Não houve diferença estatisticamente significativa para os diferentes subgrupos de linfócitos analisados nos diferentes tempos avaliados. Exceções foram observadas para o número de linfócitos T totais ($CD3^+$ (303 ± 408 vs $832 \pm 737 \times 10^6/\mu L$ $p=0,02$), linfócitos T $TCR\gamma\delta^+$ (15 ± 22 vs $51 \pm 55 \times 10^6/\mu L$ $p=0,04$), $CD3^+CD8^+$ (172 ± 208 vs $541 \pm 546 \times 10^6/\mu L$ $p=0,03$) e $CD3^+CD4^-CD8^-$ (14 ± 21 vs $54 \pm 54 \times 10^6/\mu L$ $P=0,03$);

células T citotóxicas, que eram significativamente mais elevados no dia D+30 após o transplante, entre aqueles casos que receberam um transplante de MO de doador relacionado vs um doador não relacionado, respectivamente (Tabela A 1 – Apêndice A, Figura 14).

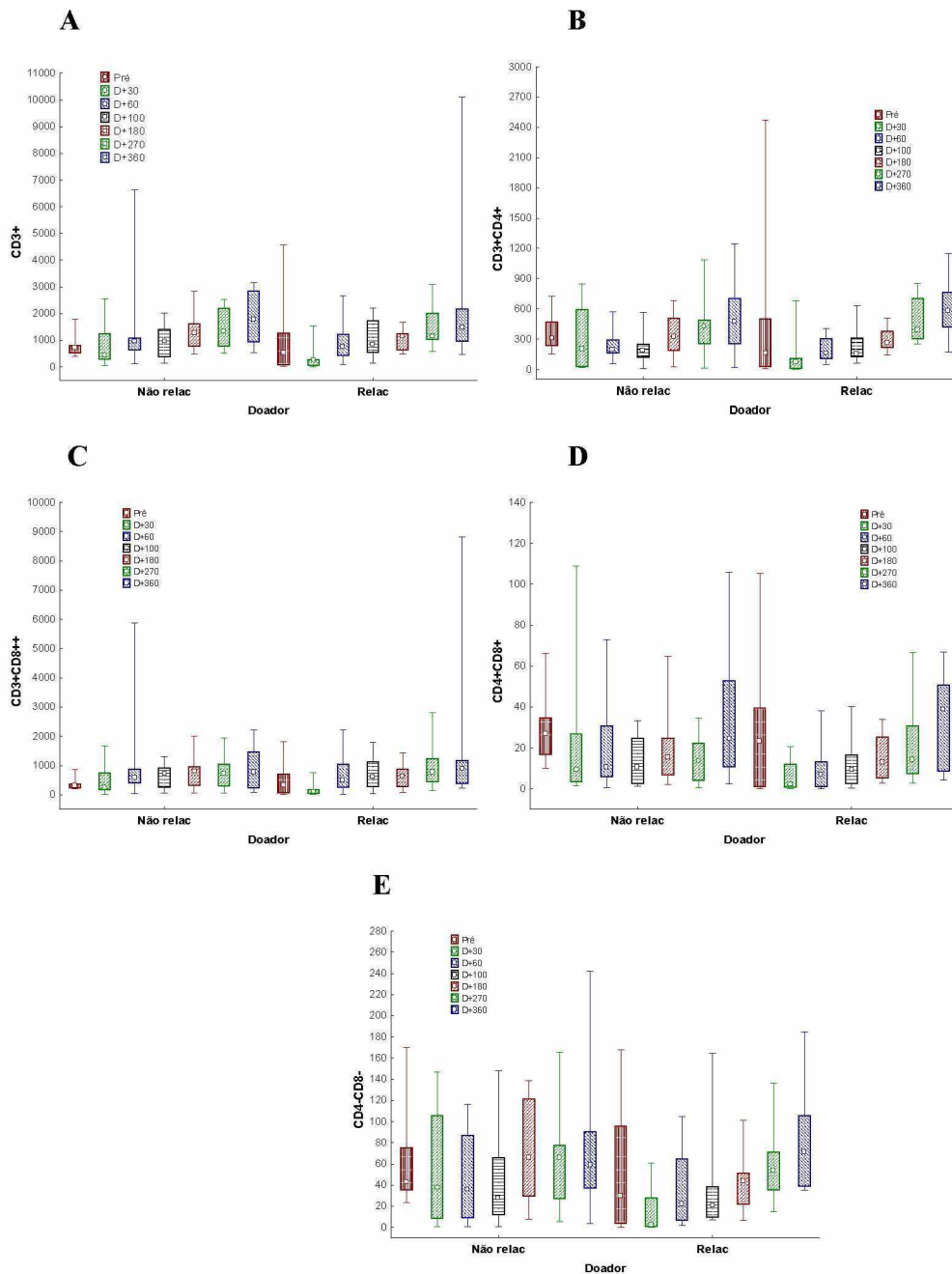


Figura 13 – Valores Absolutos dos Linfócitos: T CD3⁺ **A**, CD3⁺CD4⁺ **B**, CD3⁺CD8⁺ **C**, CD3⁺CD4⁺CD8⁺ **D** e CD3⁺CD4⁻CD8⁻ **E** no pré- e pós-tx de medula óssea, nos dias D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360. As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Períodos analisados: Pré-transplante, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360, dias pós-transplante.

5 DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO IMUNE APÓS O TMO

Um dos maiores problemas associado ao TCTH é o estado de deficiência imunológica transitória após o transplante e que determina um alto índice de morbidade e mortalidade (SCHULTZ et al., 2006). A reconstituição celular após o transplante é cada vez mais reconhecida como um fator determinante de morbidade e mortalidade por infecções oportunistas, bem como doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) em receptores de TCTH. Estudos prévios demonstraram que as células T pós-transplante do receptor são provenientes dos linfócitos T maduros presentes no enxerto do doador e das células T desenvolvidas no receptor, derivadas a partir das células-tronco hematopoéticas do doador (VOKAER et al., 2010). Enquanto que na primeira situação a transferência transitória da imunidade, que também ocorre na DECH, é mediada por células com aloreatividade para determinantes antigênicos, na última conduziria à reconstituição imunológica a longo prazo (FERRARA et al., 2009). Embora os linfócitos B são conhecidos por ser significativamente reduzidos ou mesmo indetectáveis durante os dois primeiros meses após o TCTH como observados nos estudos de Ferrara e Shimabukuro-Vornhagen, neste trabalho foi possível detectar a presença de células imaturas CD19+CD10+ precocemente após o transplante de medula óssea no dia D+60.

Neste estudo, descrevemos em detalhes a reconstituição imune de subpopulações linfocitárias em sangue periférico, durante o período de um ano, em uma série relativamente grande de pacientes com AF que receberam medula óssea de doadores aparentados e não aparentados. Embora haja poucas informações sobre a recuperação imunológica após o transplante de pacientes AF, os resultados de recuperação imune de maneira geral foram similares aos relatados em outras doenças hematológicas (revisado em PORRATA, 2004; PEGGS, 2004; AULETTA, 2005). Em resumo, encontramos diferentes cinéticas de recuperação após o transplante para as grandes populações de linfócitos distintas. As células NK foram as primeiras a recuperar, seguida pelos linfócitos T citotóxicos CD8+ e linfócitos B e, finalmente, os linfócitos T auxiliares CD4+, como encontrado por Zhu et al em 2010. Estes resultados estão de acordo com aqueles observados para outros grupos (STOREK, 1997 e 2000; Fallen, 2003; HARAGUCHI et al., 2004; SZABOLCS, 2007; 53).

Os linfócitos T recém-emigrados do timo que expressam $CD31^+CD45RA^+CD4^+$ ou $CD8^+$ e os linfócitos T $CD4^+$ virgens $CD27^+CD45RO^-$ aumentaram apenas seis meses após o transplante, na presença de agentes profiláticos imunossupressores da DECH. Em paralelo aos linfócitos T recém-emigrados do timo, o aumento dos linfócitos T virgens $CD4^+CD27^+CD45RO^-$, sugere que estes últimos não são expansões da progênie de células T virgem presentes no enxerto transplantado, mas sim que, correspondem aos novos linfócitos T auxiliares produzidos pelo hospedeiro, como encontrado por SKERT et al., 2009 e ZAHO et al., 2010. Essa predominância de células T de memória deve-se provavelmente à expansão homeostática periférica de linfócitos T de memória residuais que sobreviveram ao regime de condicionamento, como descrito por van LAAR, 2000 e THIEL et al., 2004. A proliferação homeostática ocorre em condições de linfopenia, tal qual encontrada nos pacientes nos primeiros meses após o TCTH (revisado por GOLDRATH, 2000; JAMESON, 2002, TIAN, 2007).

A expressão de $CD31^+$ em células $CD4^+$ T auxiliares tem sido associada a elevados níveis intracelulares de TRECs (círculos de excisão de receptores de células T) e representa um marcador fenotípico adequado para avaliar a reconstituição do timo em indivíduos linfopênicos após o transplante (YE et al., 2002 e SKERT et al., 2009). Não existem marcadores fenotípicos específicos para células que recém emigraram do timo, mas foi recentemente demonstrado por KIMMING et al., 2002 e NICKEL et al. em 2005, que um subgrupo de células T $CD4^+CD45RA^+$ que coexpressa o marcador $CD31$, contém células recém-imigrantes tímicas que apresentam elevados níveis de TRECs. Os TRECs são fragmentos de DNA excisados na forma de DNA circular, gerados durante o rearranjo gênico do receptor da célula T. Os TRECs são estáveis dentro das células, mas não se replicam e são diluídos com a divisão celular, portanto são ótimos marcadores de células T virgem recém-emigrantes do timo (ANNOEK et al. 2003). Nesta casuística, este subgrupo de células foi totalmente recuperado nove meses após o transplante. Embora a liberação destes novos linfócitos T recém-emigrados do timo tenha sido inicialmente detectada após três meses, vários autores evidenciaram estas células apenas em torno de seis meses pós TCTH (LAAR, 2000; MARCEL, 2002; FALLEN, 2003).

Tais diferenças aparentes podem estar relacionadas à utilização de diferentes marcadores fenotípicos substitutos para a definição dos linfócitos emigrados do timo, tais como $CD44$, $CD45RB$ e $CD62L$ (GOLDRATH, 2000; JAMESON, 2002; FALLEN, 2003).

Células T que expressam o fenótipo $CD57^+CD28^-CD4^+$ ou $CD8^+$, representam os linfócitos T senescentes, com baixo potencial de replicação *in vitro* por consequência dos telômeros reduzidos, e que determina um aumento da propensão à apoptose (BRENCHLEY et

al., 2003). Funcionalmente, eles correspondem às células T efetoras terminais de fase final. Esta população de células T $CD8^+CD28^-CD57^+$ foi descrita recentemente como uma população caracterizada por um estado de senescência replicativa, decorrente da divisão excessiva *in vivo* e consequente perda de TRECs, como demonstrado por Brenchley e cols, 2003. Além disto, estas células não expandem após estimulação e são altamente suscetíveis a apoptose. Neste estudo, no acompanhamento pós o transplante, estas células estavam aumentadas nos pacientes com GVHD e infecção por CMV, como observado também por outros autores (WANG, 1993; PAWELWC, 2002; MURARO e EFFROS, 2005; MENDES, 2008).

Ao contrário dos linfócitos recém-migrados do timo, as células $CD57^+CD28^-CD4^+$ ou $CD8^+$ senescentes, aumentaram precocemente durante o acompanhamento. Paralelamente ao aumento desta população ocorreu a recuperação dos linfócitos efetores de memória e terminal $CD4^+$ e também $CD8^+$, bem como as células T duplo-negativas ($CD4^-CD8^-$) e as células NKT. O aumento dos linfócitos T citotóxicos e auxiliares é potencialmente devido à ativação e diferenciação das células T de memória, uma vez que, em contraste com as células T $CD4$ virgens e as células T tímicas recém-emigradas do timo, estas células efetoras terminais não aumentaram e nem diminuíram ao longo de todo o período do seguimento, como demonstrado em outros estudos: NIEDERWIESER et al., 1987, STOREK et al., 1997; e MERINDOL et al., 2011.

No geral, os resultados desta pesquisa sugerem que a transferência de linfócitos pertencentes ao doador leva ao rápido aumento do compartimento de células NK, principalmente das células ativadas $CD69^+$, seguida imediatamente por um aumento de todos os compartimentos de células T citotóxicas (efetoras) e também de linfócitos B.

Ao contrário, as células T auxiliares $CD3^+CD4^+$ recentemente produzidas, conduziria a uma recuperação do compartimento de células T virgens apenas num tempo mais longo, como já demonstrado (HARAGUCHI et al., 2004). Estes resultados encontrados estão concordantes com estudos anteriores, que mostram uma recuperação rápida das células NK, representando tais células a maioria dos mononucleares do sangue periférico no início do pós-transplante, como os estudos de Storek e cols, 1997 e outros grupos (MARCEL et al. e JAMESON et al., 2002; HARAGUCHI, 2004; SZABOLCS et al., 2007). Em contrapartida, a recuperação dos linfócitos B e T, células T $CD4^+$ em particular, é substancialmente tardia, tendendo a permanecer baixa por até 12 meses após o transplante, que foi o tempo de observação deste estudo; ou até mesmo em longos períodos, em pacientes que desenvolvem GVHD crônica, como descrito por KLEIN et al., 1995 e FEDELE et al., 2012. Em contraste,

o número de células T CD8⁺ retorna ao nível normal muito rápido, como encontrado por IANG et al., 1997, como também encontrado neste estudo.

As células T reguladoras (Tregs) CD4⁺CD25^{fo} são geradas pelo timo, descritas por Sakaguchi e col. em 2004 e podem ser reconstituídas no período de reativação da atividade tímica após o transplante. Também podem ser geradas na periferia como células T periféricas não-Treg e adquirirem a expressão de FOXP3 e se converterem em células Tregs após estimulação antigênica crônica ou em condições de linfopenia, como já descrito por Fehérvári et al e Zoltán et al et al. em 2004. As células Tregs CD4⁺CD25^{fo} expressam, entre outros marcadores, os receptores CD127, GITR e FOXP3 (Sakaguchi e Muriglan, 2004; Fontenot et al, 2005; Liu et al, 2006; Hlichey et al, 2007). A utilização dos marcadores CD25, CD127 e FOXP3, além de CD4, aumenta a possibilidade de remover a população de célula T efetora. Notavelmente observamos que as células T reguladoras, particularmente aquelas que coexpressam CD4⁺, CD127^{fr}, GITR⁺ e FOXP3⁺, aumentaram significativamente em torno do D+270. As Tregs desempenham um papel fundamental na manutenção da tolerância após o transplante de células-tronco alogênico (BLUESTONE e WOOD, 2003; FEHÉRVÁRI e WALSH, 2004; IANNI, 2001).

Quando comparamos os resultados pacientes após um ano do TMO com o grupo controle, observamos que a maioria das células atingiu a normalidade (grupo controle): linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos. Porém, quando avaliamos a janela linfocitária, observamos que mesmo após um ano, algumas populações linfocitárias como os linfócitos T auxiliares CD4⁺, os linfócitos T duplo negativos CD3⁺CD4⁻CD8⁻, os linfócitos T CD4⁺ recém-emigrados do timo, os linfócitos T CD4⁺ virgens e de memória central os linfócitos B imaturos e maduros, os linfócitos NK, os linfócitos NKT. Em contrapartida, houve um aumento importante para as populações linfoides T CD8⁺ virgem, memória central, efetora e efetora diferenciada, senescentes e os linfócitos T CD4⁺ reguladores dos pacientes em relação ao grupo controle.

Apesar da cinética semelhante tanto no grupo de paciente com AF que recebeu TMO aparentado e quanto não aparentado, foram observadas diferenças no tempo de recuperação de células T totais e destas as células T CD8⁺, mais precoce no grupo que recebeu MO não aparentada; porém no D+100, ambas as populações de células foram semelhantes nos dois grupos de pacientes. Tais diferenças podem ser potencialmente devidas a um aumento de células T mediadas por alo reatividade entre os pacientes que receberam o transplante a partir de doadores não aparentados.

Em resumo, neste estudo, com base na evolução de pacientes com Anemia de Fanconi submetidos a transplante de medula óssea, mostramos que a cinética de recuperação das diferentes populações de linfócitos segue em geral os padrões descritos para pacientes com outras doenças hematológicas: recuperação precoce das células NK, seguida por células T citotóxicas efectoras e células B e, finalmente, as células T auxiliares CD4⁺. Curiosamente, a recuperação precoce parece ser devida à expressão de células de memória potencialmente derivadas do enxerto, enquanto que a recuperação mais tardia das células recém-emigradas do timo e das células T virgens indica recuperação da produção de linfócitos T a partir de células-tronco hematopoéticas transplantadas. Além disso, este estudo mostra a existência de pequenas diferenças na recuperação precoce de células T citotóxicas entre os casos que receberam um enxerto de doador relacionado e não relacionado, além de mostrar clara diferença entre os casos que apresentaram GVHD *vs* todos os outros pacientes, sugerindo a potencial utilidade de monitoramento do sangue periférico no pós-transplante das subpopulações linfocitárias, a fim de melhorar a monitorização e acompanhamento dos pacientes submetidos a TMO.

6 CONCLUSÕES

- 1) Após o transplante, houve uma predominância de células T $CD3^+CD4^+$ virgens, de memória central, memória efetora e também de células T efetoras diferenciadas, bem como de linfócitos T $CD3^+CD8^+$, de memória central e de memória efetora. Esse fato é provavelmente devido à expansão homeostática periférica de linfócitos T de memória residuais que sobreviveram ao regime de condicionamento ou foram reinfundidos com as células tronco no momento do transplante.
- 2) O número de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ virgens, incluindo as células T $CD45RA^+CD31^+$ recém-emigrados do timo, recuperou os níveis basais durante o período pós-transplante analisado.
- 3) Os linfócitos T senescentes, $CD57^+CD28^-CD4^+$ ou $CD8^+$, aumentaram muito após um ano, principalmente nos pacientes com DECH e infecções.
- 4) O número de linfócitos B $CD19^+$ voltou aos níveis basais 100 dias pós-transplante.
- 5) Foi observada reconstituição das células T reguladoras $CD4^+CD25^{fo}CD127^{fr}FOXP3^+$ e/ou $CD4^+CD25^{fo}GITR^+FOXP3^+$ após o transplante, em torno de 9 meses, o que sugere expansão homeostática dessas células dentro da população de células T $CD3^+CD4^+$. Esses resultados sugerem uma melhora de mecanismos reguladores que podem contribuir para o restabelecimento da autotolerância nos pacientes submetidos ao TMO.
- 6) As células NK retornaram aos níveis pré-transplante sessenta dias após o TMO.
- 7) A evolução da resposta imune dos pacientes transplantados, foram comparadas ao grupo controle saudável. Após um ano do TMO as seguintes células **não** atingiram a normalidade: os linfócitos T auxiliares $CD3^+CD4^+$, linfócitos T duplo negativos $CD3^+CD4^-CD8^-$, os linfócitos T recém emigrados do timo $CD31^+CD45RA^+CD4^+$ ou

CD8⁺, os linfócitos T CD4⁺ virgens CD27⁺CD45RO⁻ e de memória central CD27⁺CD45RO⁺, os linfócitos T reguladores 25^{fo}CD127^{fr}FOXP3⁺ e/ou 25^{fo}GITR⁺FOXP3⁺, os linfócitos NKT CD3⁺CD16⁺CD56⁺, os linfócitos NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ e os linfócitos B ativados CD69⁺CD19⁺.

- 8) No entanto as populações dos linfócitos T CD8⁺ virgens CD27⁺CD45RO⁻, de memória efetora CD27⁻CD45RO⁺, efetores diferenciados CD27⁻CD45RO⁻, além dos linfócitos T CD8⁺ senescentes CD57⁺CD28⁻, aumentaram significativamente em relação ao grupo controle.
- 9) Quando comparamos a recuperação imune dos pacientes que receberam MO aparentada e não aparentada, observamos algumas diferenças: o grupo que recebeu MO não aparentada, recuperaram os linfócitos T CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁻CD8⁻ mais precocemente (D+30), porém um ano após o TMO os níveis foram próximos nos dois grupos.
- 10) A monitoração das células T CD4⁺ auxiliares virgens e as recém-emigradas do timo, das células B, NK e T CD8⁺ citotóxicas, além das células senescentes, nos dias D+100, D+180 e D+360 pós TMO, poderá ser particularmente informativa na avaliação após o transplante de medula óssea em pacientes com Anemia de Fanconi.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABRAHAMSEN, I. et al. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. **Haematologica**, 2005, 90 (1): 86-93.

ACUTO, O.; CANTRELL D. T. Cell activation and the cytoskeleton. **Annual Review of Immunology**, 2000, 18:165-184.

AKPEK, G. et al. Performance of a new clinical grading system for chronic graft-versus-host disease: a multicenter study. **Blood**, 2013, 102: 802-809.

ANNOEK, E. C. et al. Lymphocyte recovery following allogeneic stem cell transplantation: New possibilities for improvement. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, 2002, 2, 217-227.

ARCESE, W.; AVERSA, F.; BANDINI, G. Clinical use of allogeneic hematopoietic stem cells from sources other than bone marrow. **Haematologica**, 2001, 83:159-182.

AULETTA, J. J.; LAZARUS, H. M. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. **Bone Marrow Transplantation**, 2005, 35: 835-857.

BALL, M.; EGELER, M. Acute GvHD: pathogenesis and classification. **Bone Marrow Transplantation**, 2008, 41:S58-S64.

BARRETT, J. et al. **New developments in allotransplant immunology**. American Society of Hematology. 2. ed. Philadelphia, PA., USA: Lippincott Williams&Wilkins, 2003. p. 350-371.

BERRIE, J. et al. Distinct oligoclonal T cells are associated with graft versus host disease after stem-cell transplantation. **Transplantation**, 2012, 15; 93 (9): 949-957.

BLUESTONE, J. A.; ABBAS, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nature Reviews Immunology**, 2003, 3: 253-257.

BRENCHLEY, J. M. et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8 + T cells. **Blood**, 2003, 101: 2711-2720.

BROERS, A. C. Z. et al. Interleukin-7 improves T-cell recovery after experimental T-cell-depleted bone marrow transplantation in T-cell deficient mice by strong expansion of recent thymic emigrants. **Blood**, 2003, 102:1534-1540.

CAILLAT-ZUCMAN, S. et al. Impact of HLA matching on outcome of hematopoietic stem cell transplantation in children with inherited diseases: a single-center comparative analysis of genoidentical, haploidentical or unrelated or unrelated donors. **Bone Marrow Transplantation**, 2004, 33: 1089-1095.

CHATENOUD, L.; BACH, J. F. Adaptive human regulatory T cells: myth or reality? **The Journal of Clinical Investigation**, 2006, 116 (9): 2325-2327.

CHEN, X., et al. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. **Blood**, 2007, 110, (10): 3804-3813.

CIEBIADA, M. et al. Expression of IL-7 receptor in human peripheral regulatory T cells. **Archives of Medical Sciences**, 2013, 9: 555-560.

CLARK, J. F. et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4-CD25 high regulatory T cells. **Blood**, 2004, 103: 2410-2416.

COLIN, A. et al. Congenital bone marrow failure syndromes. **British Journal of Haematology**, 2000, 111: (1) 30-42.

CUTLER C.; ANTIN, J. H. Peripheral blood Stem cells for allogeneic transplantation: A Review. **Stem Cells**, 2001, 19: 108-117.

DALE, J. H. HSCT for Fanconi anemia in children: factors that influence early and late results. **Bone Marrow Transplantation**, 2008, 42: S51-S53.

DONALL et al. **Thoma's Hematopoietic Cell Transplantation**. 10. ed. Blackwell Science, 1999.

DOUEK, D. C. The contribution of the thymus to immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. **Cytotherapy**, 2002, 4: 425-426.

EFFROS, R. B. et al. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. **Immunology Review**, 2005, 205: 147-157.

EILER, M. E. et al. **Fanconi Anemia: guidelines for diagnosis and management**. 3 ed. Eugene, OR: Fanconi Anemia Research Fund, 2008.

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

_____. Identification of non-naïve CD4+CD45RA+ T cell subsets in adult allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. **Bone Marrow Transplantation**, 2003, 32: 609-616.

_____. Lymphoid Reconstitution Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. **Bone Marrow Transplantation**, 2003, 32: 1001-1014.

FARIAS, K. C. M.; COVAS, D. T. **Avaliação da reconstituição imunológica em pacientes com diabete melito tipo I e esclerose múltipla após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas**. 169f. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, 2006.

FEDELE, R. et al. The impact of early CD4+ lymphocyte recovery on the outcome of patients who undergo allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. **Blood Transfusion**, 2012, 10 (2): 174-180.

FEHÉRVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. CD4+ tregs and immune control. **The Journal of Clinical Investigation**, 2004, 114:1209-1217.

FERRARA, J. L. M. et al. Graft-versus-host disease. **The Lancet**, 2009, 373: 1550-1561.

FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nature Immunology**, 2005, 6 (4): 331-337.

GLUCKMAN, E., WAGNER, J. E. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood inherited bone marrow failure syndrome. **Bone Marrow Transplantation**, 2008, 41: 127-132.

GODFREY, W. R. et al. Cord blood CD4+CD25+ derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. **Blood**, 2005, 105: 750-758.

GOLDRATH, A. W.; BOGATZKI, L. Y.; BEVAN, M. J. Naïve T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. **Journal of Experimental Medicine**, 2000, 192 (4): 557-564.

GREEN, A. M; KUPFER, G. M. Fanconi anemia. **Hematology Oncology Clinical North America**, 2009, 23 (2): 193-214.

HANASH, A. M.; LEVY, R. B. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. **Blood**, 2005, 105: 1828-1836.

HARAGUCHI, K. et al. Recovery of Va24 β NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, 2004, 34: 595-602.

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**, 2002, 99: 3449-3453.

HESS, A. D. Modulation of graft-versus-host disease: role of regulatory T lymphocytes. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, 2006, 12 (1): 13-21.

HILCHEY, S. P. et al. Follicular lymphomaintratatumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells. **Journal of Immunology**, 2007, 178:4051-4061.

HOLLER, E. et al. Find all citations by this author (default). **Bone Marrow Transplantation**, 2000, 25 (3): 237-241.

HORI, S.; NOMURA, T., SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, 2003, 299: 1057-1061.

IANNI, M. D. et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. **Blood**, 2011, 117: 3921-3928.

ITOH, M. et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **The Journal of Immunology**, 1999, 162: 5317-5326.

JAMESON, S. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, 2002, 2:547-556.

JIANG, Y. Z. et al. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. **Annals of Hematology**, 1997, 74(1): 1-6.

KIMMING, S. et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. **Journal of Experimental Medicine**, 2002, 195: 789-794.

KLEIN C. et al. Bone marrow transplantation in major histocompatibility complex CII, nmass II deficiency: a single-center study of 19 patients. **Blood**, 1995, 85, (2) 15: 580-587.

KOHLER, S.; THIEL, A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell. **Blood**, 2009, 113: 769-774.

KUTLER, D. I. et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**, 2003, 101 (4): 1249-1256.

LAAR, J. M. Immune ablation and stem cell therapy in autoimmune disease: immunologic reconstitution after high-dose immunosuppression and haematopoietic stem-cell transplantation. **Arthritis Research**, 2000, 2: 270-275.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. **The Journal of Experimental Medicine**, 2006, 203: 1701-1711.

LOCATELLI, F. et al. The changing role of stem cell transplantation in childhood. **Bone Marrow Transplantation**, 2008, 41:S3-S7.

MacMILLAN, M.; WAGNER, J. E. Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia – when and how? **British Journal of Haematology**, 2010, 149 (1) 14-21.

MAGENAU, J. M. et al. Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute-versus-host-disease. **Biology Blood Marrow Transplantation**, 2010, 16: 907-914.

MARCEL, R. M. van den Brink; BURAKOFF, S. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. **Nature Reviews Immunology**, 2002, 2: 273-281.

MEDEIROS, C. R. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an alternative stem cell source in Fanconi anemia patients: analysis of 47 patients from a single institution brazilian. **Journal of Medical and Biological Research**, 2006, 39: 1297-1304.

MENDES, A. V. et al. Impacto of cytomegalovirus and graft versus host disease on the dynamics of CD57+CD28-CD8+ T cells after bone marrow transplant. **Clinics**, 2008, 63 (5): 667-676.

MERINDOL, N. et al. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. **Journal of Leukocyte Biology**, 2011, 90: 49-60.

MICHEL, G. et al. Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord analysis. **Blood**, 2003, 102: 4290-4297.

MIELCAREK, M. et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, 2003, 15: 756-762.

MURARO, P. A. et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. **Journal of Experimental Medicine**, 2005, 201 (5): 805-816.

MURIGLAN, S. J. et al. GITR activation induces an opposite effect on alloreactive CD4 and CD8 T cells in graft-versus-host disease. **The Journal of experimental in Medicine**, 2004, 200 (2): 149-157.

MYRES, K. C.; DAVIES, S. M. Hematopoietic stem cell transplantation for bone marrow failure syndromes in children. **Biology Blood Marrow Transplantation**, 2009, 15 (3): 279-292.

NICKEL, P. et al. CD31+ naive Th cells are stable during six months following kidney transplantation: implications for post-transplant thymic function. **American Journal of Transplantation**, 2005, 5: 1764-1771.

NIEDERWIESER, D. et al. Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT). **British Journal Haematology**, 1987, 65:30-305.

OHATA, J.; SAKURAI, J.; AZUMA, M. Differential graft-versus-leukaemia effect by CD28 and CD40 costimulatory blockade after graft-versus-host disease prophylaxis. **Clinical & Experimental Immunology**, 2002, 129:61-68.

PAWELEC, G. et al. Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for immunological risk phenotypes. **Trends in Immunology**, 2002, 23 (7): 330-332.

PEGGS, K.; MACKINNON, S. Immune reconstitution following haematopoietic stem cell transplantation. **British Journal of Haematology**, 2004, 124 (4): 407-420.

PEREIRA, C. M. et al. Late complication of allogeneic bone marrow transplantation: retrospective study of 98 receptor patients. **Journal Health Science Institute**, 2010, 28:64-66.

PETERSDORF, E. W. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. **Current Opinion Hematology**, 2004, 11:386-391.

_____. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. **Blood**, 2004, 104: 2976-2980.

PINTO, F. O. et al. Diagnosis of Fanconi anemia in patients with bone marrow failure. **Haematologica**, 2009, 94: (4) 487-495.

PORRATA, L. F.; MARKOVIC, S. N. Review. Timely reconstitution of immune competence affects clinical outcome following autologous stem cell transplantation. **Clinical and Experimental Medicine**, 2004, 4 (2):78-85.

QUEZADA, S. A. et al. Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154 induced graft tolerance: The interplay of clonal anergy and immune regulation. **The Journal of Immunology**, 2005, 175: 2771-2779.

RATANATHARATHORN, V. et al. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. **Bone Marrow Transplantation**, 2001, 28: 121-129.

REIMER, P. et al. Cellular and humoral immune reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). **Annals of Hematology**, 2003, 82: 263-270.

REIS, M. A. L.; VISENTAINER, J. E. L. Immunology reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2004, 26:212-217.

ROZMUS, J. et al. Early and late extensive chronic graft-versus-host disease in children is characterized by different Th1/Th2 cytokine profiles: findings of the Children's Oncology Group Study ASCT0031. **Biology Blood and Marrow Transplantation**, 2011, 17:1804-1813.

SAITOH, A. et al. Association of CD4+ T-lymphocyte counts and new thymic emigrants in HIV-infected children during successful highly active antiretroviral therapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2006, 117:909-915.

SAKAGUCHI, S. CD4+CD25+ Suppressor T cell: More Questions Than Answers. **Annual Reviews Immunology**, 2004, 22:531-562.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of Immunology**, 1995, 155(3):1151-64.

SAKODA, Y. et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. **Blood**, 2007, 109: 4.

SCHULTZ, K. R. et al. Toward biomarkers for chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. Biomarker Working Group Report. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, 2006, 12 (2): 126-137.

SHIMABUKURO-VORNHAGEN, A. et al. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. **Blood**, 2009, 114: 4919-4927.

SHUANG, L. et al. Conversion of CD4+CD25+ cells into CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. **The Journal of Experimental Medicine**, 2005, 201: 127-137.

SHUKLA, P.; GHOSH, K.; VUNDINTI, B. R. Current and emerging therapeutic strategies for Fanconi anemia. **Hugo Journal**, 2012, 6: 1-8.

SKERT, C. et al. Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study. **Bone Marrow Transplantation**, 2009, 44: 729–737.

SOIFER, R. Immune modulation and chronic graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplantation**, 2008, 42:S66-S69.

SOULIER, J. **Fanconi anemia**. American Society of Hematology, 2011. p. 492-497.

STOCKINGER, B.; BARTHLOTT, T.; KASSIOTS, G. The concept of space and competition in immune regulation. **Immunology**, 2004, 111: 241-247.

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**, 1997, 54:131-8.

STOREK, J.; STORB, R. T-cell reconstitution after stem-cell transplantation – by which organ? **The Lancet**, 2000, 355 (9218): 1843-1844.

SVAHN, J.; DUFOUR, C. Fanconi anemia – learning from children. **Pediatric Reports**, 2011, 3:(s2): 18-20.

SZABOLCS, P. The immunobiology of cord blood transplantation. **The Korean Journal of Hematology**, 2010, 45 (4): 224-235.

SZABOLCS, P.; NIEDZWIECKI, D. Immune reconstitution in children after unrelated cord blood transplantation. **Cytotherapy**, 2007, 9 (2): 111-122.

TARNOK, A. et al. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. **Clinical Chemistry**, 2003, 49 (6): 1000-1002.

TESHIMA, T.; FERRARA, J. M. Understanding the alloresponse: new approaches to graft-versus-host disease prevention. **Seminars in Hematology**, 2002, 39(1):15-22.

THIEL, A. et al. Immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. In: **Stem cell therapy for autoimmune diseases**. Burt RK Marmont A (eds). Georgetown, Texas, USA: Landes Biosciences, 2004. p. 206-222.

TIAN, C.; BAGLEY, J.; UACOMINI, J. Homeostatic expansion permits T cells to re-enter the thymus and deliver antigen in a tolerogenic fashion. **American Journal of Transplantation**, 2007, 7: 1934-1941.

VOKAER, B. et al. Critical role of regulatory t cells in th17-mediated minor antigen-disparate rejection. **The Journal of Immunology**, 2010, 185 (6): 3417-3425.

VOLTARELLI, J. C. et al. Autologus hematopoietic stem cell transplantation for type 1 diabetes. **Annals of the New York Academy os Sciences**, 2008, 1150:220-229.

_____. **Transplante de células-tronco hematopóéticas**. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 57-92.

WALSH, P. T.; TAYLOR, K. T.; TIRKA, L. A. Tregs and transplantation tolerance. **The Jorurnal of Clinical Investigation**, 2004, 114: 1398-1403.

WANG, E. C. Y. et al. Subsets of CD8 +, CD57+ cells in normal, healthy individuals: correlations with human cytomegalovirus (HCMV) carrier status, phenotypic and functional analyses. **Clinical & Experimental Immunology**, 1993, 94 (2): 297-305.

WELNIAK, L. A.; BLAZAR, B. R.; MURPHY, W. J. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Annual Review of Immunology**, 2007, 25: 139-170.
WOOD, K. J.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. **Nature Reviews Immunology**, 2003, 3: 199-210.

YAGI, H. et al. Cutting edge: Il-12 induces CD4+CD25+ T cell activation in the presence of T regulatory cells. **The Journal of Immunology**, 2005, 175: 641-645.

YE, P.; KIRSCHNER, D. E. Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. **The Journal of Immunology**, 2002, 169: 4968-4979.

ZAHO, C.; DAVIES, J. D. A peripheral CD4+ T cell precursor for naive, memory, and regulatory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, 2010, 207 (13): 2883-2894.

ZHU, J.; YAMANE, H.; WILLIAM, E. P. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annual Review Immunology**, 2010, 28:445-48.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela A 1 – Análise comparativa do perfil imune em pacientes que receberam MO de doador aparentado (AP) e MO de doador não aparentado (NAP)

Tabela A 1 – Análise Comparativa do Perfil Imune em Pacientes que Receberam MO de Doador Aparentado (AP) e MO de Doador Não Aparentado (NAP)

Variável/ μ L	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
Linfócitos						
PRÉ	AP	11	722,3	28,8	6455,1	0,503
	NAP	9	961,7	664,1	2469,6	
D+30	AP	12	493,4	89,0	2547,7	0,118
	NAP	11	820,0	140,2	2745,7	
D+60	AP	11	1059,1	484,4	3658,1	0,797
	NAP	11	1422,9	128,7	7443,8	
D+100	AP	11	1049,4	393,2	2692,7	0,748
	NAP	11	1140,8	168,1	2152,0	
D+180	AP	10	1381,0	866,5	1813,4	0,282
	NAP	11	1568,7	1027,5	4170,1	
D+270	AP	11	2035,7	979,4	3353,9	0,918
	NAP	10	1715,4	887,8	3642,2	
D+360	AP	11	1886,8	1163,2	10802,3	0,654
	NAP	10	2210,5	970,0	4052,7	
Monócitos						
PRÉ	AP	11	77,5	0,5	441,2	0,152
	NAP	9	147,2	27,2	358,4	
D+30	AP	12	665,3	220,6	1216,2	0,288
	NAP	11	487,2	24,2	930,7	
D+60	AP	11	388,8	208,4	1556,6	0,847
	NAP	11	503,7	87,5	675,1	
D+100	AP	11	245,1	185,3	640,3	0,847
	NAP	11	268,8	91,4	806,4	
D+180	AP	10	449,6	177,2	969,0	0,863
	NAP	11	355,1	68,5	836,8	
D+270	AP	11	373,4	179,2	1443,2	0,282
	NAP	10	467,8	85,1	975,2	
D+360	AP	11	509,0	115,2	1352,1	0,809
	NAP	10	424,0	172,5	612,7	
Eosinófilos						
PRÉ	AP	11	1,5	0,0	30,5	0,095
	NAP	9	9,6	0,0	44,5	
D+30	AP	12	129,2	13,3	663,9	0,134
	NAP	11	58,0	0,0	586,5	
D+60	AP	11	381,3	0,0	823,1	0,171
	NAP	11	137,1	5,8	672,9	
D+100	AP	11	229,3	4,5	439,9	0,171
	NAP	11	82,9	7,7	523,0	
D+180	AP	10	178,2	15,4	650,0	0,512
	NAP	11	155,1	8,6	717,4	
D+270	AP	11	209,8	13,6	1023,6	0,314
	NAP	10	120,8	13,9	283,3	
D+360	AP	11	176,6	30,5	1105,5	0,973
	NAP	10	200,4	57,1	491,4	

Neutrófilos

PRÉ	AP	11	1459,5	573,9	3063,7	
	NAP	9	1966,9	281,1	3389,6	0,456
D+30	AP	12	1950,4	729,1	16544,4	
	NAP	11	1826,3	206,4	6524,4	0,413
D+60	AP	11	2948,6	875,0	18272,3	
	NAP	11	2408,8	865,0	6219,8	0,478
D+100	AP	11	1936,5	428,8	5265,8	
	NAP	11	2202,6	626,4	5114,9	0,652
D+180	AP	10	3202,8	605,9	8081,2	
	NAP	11	2643,8	189,9	8583,8	0,468
D+270	AP	11	2622,8	517,9	15435,1	
	NAP	10	2892,3	1644,0	5916,9	0,705
D+360	AP	11	2102,2	1614,1	17460,1	
	NAP	10	2997,2	1868,2	6915,8	0,251

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD3+						
PRÉ	AP	11	538,8	14,9	4571,5	
	NAP	9	722,7	396,6	1788,8	0,503
D+30	AP	12	262,5	11,9	1524,3	
	NAP	11	450,9	45,9	2554,0	0,019
D+60	AP	11	746,0	93,2	2660,2	
	NAP	11	950,6	114,0	6632,5	0,562
D+100	AP	11	837,3	139,8	2199,9	
	NAP	11	961,7	151,4	2025,2	1,000
D+180	AP	10	1138,6	481,3	1680,1	
	NAP	11	1267,0	493,6	2830,7	0,314
D+270	AP	11	1158,5	583,4	3081,9	
	NAP	10	1333,8	512,2	2530,6	0,809
D+360	AP	11	1470,7	469,8	10111,0	
	NAP	10	1771,3	541,6	3160,8	0,654
CD3+CD4+						
PRÉ	AP	11	163,2	7,2	2474,2	
	NAP	9	311,9	154,6	722,5	0,331
D+30	AP	12	74,6	2,4	682,5	
	NAP	11	204,2	19,2	845,7	0,069
D+60	AP	11	166,6	50,6	406,0	
	NAP	11	194,5	58,6	572,4	0,519
D+100	AP	11	152,5	64,8	630,3	
	NAP	11	185,3	6,5	562,5	1,000
D+180	AP	10	259,3	138,9	512,2	
	NAP	11	325,5	23,1	678,1	0,918
D+270	AP	11	394,2	252,9	851,5	
	NAP	10	422,8	13,0	1085,2	0,756
D+360	AP	11	580,8	173,7	1149,4	
	NAP	10	472,6	16,3	1248,1	0,468
CD3+CD8+						
PRÉ	AP	11	335,9	7,3	1817,1	
	NAP	9	306,9	199,0	858,4	0,656
D+30	AP	12	115,1	8,8	752,3	
	NAP	11	258,9	20,5	1656,2	0,032

D+60	AP	11	493,4	18,6	2215,7	
	NAP	11	575,4	28,7	5879,1	0,606
D+100	AP	11	612,3	37,7	1801,9	
	NAP	11	726,5	56,1	1310,9	1,000
D+180	AP	10	631,2	80,2	1425,7	
	NAP	11	798,3	57,0	1998,3	0,809
D+270	AP	11	775,7	139,5	2798,8	
	NAP	10	731,0	62,4	1933,6	0,605
D+360	AP	11	876,8	219,8	8813,6	
	NAP	10	783,3	72,4	2217,3	0,705

Variável μL	Doador	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD4+CD8+						
PRÉ	AP	11	1,6	0,0	5,8	
	NAP	9	1,1	0,2	4,9	1,000
CD+30	AP	12	0,4	0,0	7,6	
	NAP	11	1,3	0,0	11,6	0,091
D+60	AP	11	1,6	0,2	6,1	
	NAP	11	1,4	0,0	4,9	0,797
D+100	AP	11	2,0	0,4	8,7	
	NAP	11	0,8	0,2	7,3	0,193
D+180	AP	10	2,6	0,7	9,4	
	NAP	11	1,7	0,5	9,0	0,654
D+270	AP	11	3,8	1,3	14,4	
	NAP	10	2,1	0,1	8,5	0,197
D+360	AP	11	5,0	1,3	25,9	
	NAP	10	1,6	0,1	13,8	0,061
CD4-CD8-						
PRÉ	AP	11	29,8	0,1	167,8	
	NAP	9	43,2	23,4	170,2	0,295
D+30	AP	12	2,4	0,2	60,9	
	NAP	11	37,6	0,5	146,7	0,032
D+60	AP	11	22,3	1,9	104,5	
	NAP	11	35,8	0,8	116,1	0,699
D+100	AP	11	20,5	6,8	164,5	
	NAP	11	27,6	0,9	147,8	0,519
D+180	AP	10	43,5	6,5	101,1	
	NAP	11	66,1	7,9	138,5	0,197
D+270	AP	11	54,0	14,8	136,5	
	NAP	10	65,7	5,4	165,3	0,973
D+360	AP	11	71,3	35,1	184,7	
	NAP	10	59,5	3,6	241,9	0,654

Variável μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
45RA+31+4+						
PRÉ	AP	11	32,9	2,0	914,0	
	NAP	9	90,9	20,0	360,8	0,412
D+30	AP	12	2,1	0,3	95,0	
	NAP	11	6,7	0,2	291,6	0,379

D+60	AP	11	4,4	0,7	84,1	
	NAP	11	22,7	0,9	108,2	0,401
D+100	AP	11	2,4	0,8	313,6	
	NAP	11	30,7	0,2	426,1	0,365
D+180	AP	10	41,8	1,1	186,6	
	NAP	11	60,5	0,5	384,8	0,654
D+270	AP	11	155,5	1,0	399,6	
	NAP	10	181,5	0,6	793,8	0,863
D+360	AP	11	231,8	2,2	467,9	
	NAP	9	159,9	8,1	796,9	0,766

Variável / μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
45RA+31+8+						
PRÉ	AP	11	240,5	1,3	1285,2	
	NAP	9	211,2	67,0	655,4	0,710
D+30	AP	12	16,6	0,0	437,4	
	NAP	11	87,9	2,7	420,3	0,169
D+60	AP	11	87,1	2,1	354,2	
	NAP	11	164,5	9,6	3200,8	0,562
D+100	AP	11	102,3	3,9	523,8	
	NAP	11	142,9	22,0	829,3	0,519
D+180	AP	10	211,3	10,0	615,8	
	NAP	11	123,7	22,8	837,7	0,557
D+270	AP	11	282,7	91,1	1515,3	
	NAP	10	238,4	21,4	789,8	0,387
D+360	AP	11	525,1	130,2	4518,6	
	NAP	9	200,7	98,9	784,0	0,370

Variável / μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
TCR$\alpha\beta$+						
PRÉ	AP	11	517,9	14,6	4403,7	
	NAP	9	647,6	364,0	1623,8	0,503
D+30	AP	12	233,1	11,6	1463,4	
	NAP	11	440,5	41,9	2538,1	0,032
D+60	AP	11	644,2	91,4	2640,8	
	NAP	11	882,3	113,0	6427,7	0,606
D+100	AP	11	826,7	130,3	2182,9	
	NAP	11	944,1	149,9	1877,4	1,000
D+180	AP	10	1077,2	458,3	1628,6	
	NAP	11	1174,7	464,4	2648,0	0,387
D+270	AP	11	1119,8	565,8	3067,1	
	NAP	10	1274,8	482,2	2453,0	0,809
D+360	AP	11	1364,3	433,4	10039,7	
	NAP	10	1684,2	475,6	3039,0	0,654

Variável / μ L	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
TCR$\gamma$$\delta$+						
PRÉ	AP	11	29,8	0,2	167,8	
	NAP	9	48,5	18,1	170,2	0,261
D+30	AP	12	2,5	0,2	60,9	
	NAP	11	15,9	0,5	146,7	0,037
D+60	AP	11	24,5	1,9	104,5	
	NAP	11	35,8	1,0	204,7	0,652
D+100	AP	11	20,5	6,8	220,4	
	NAP	11	27,6	1,5	147,8	0,365
D+180	AP	10	50,2	6,5	106,6	
	NAP	11	66,1	14,0	182,7	0,251
TCRGD D+270	AP	11	65,7	14,8	136,5	
	NAP	10	74,1	19,1	174,7	0,387
TCRGD D+360	AP	11	71,3	35,1	184,7	
	NAP	10	83,2	34,6	241,9	0,654

Variável / μ L	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD69+CD3+						
PRÉ	AP	9	42,3	1,1	95,0	
	NAP	8	36,0	6,0	86,4	1,000
D+30	AP	11	1,7	0,3	79,7	
	NAP	9	21,0	3,0	96,6	0,031
D+60	AP	8	20,7	0,0	62,0	
	NAP	10	15,9	2,8	491,3	0,360
D+100	AP	10	7,1	0,7	32,0	
	NAP	11	18,5	3,3	47,3	0,152
D+180	AP	10	15,7	5,8	80,0	
	NAP	8	35,6	7,7	84,4	0,360
D+270	AP	10	21,4	2,1	51,7	
	NAP	8	19,8	3,3	65,3	0,633
D+360	AP	10	19,6	2,5	81,5	
	NAP	8	14,7	5,7	156,0	0,965
CD69+CD19+						
PRÉ	AP	9	10,2	0,6	34,2	
	NAP	8	16,9	0,4	55,4	0,236
D+30	AP	11	19,8	0,5	261,5	
	NAP	9	25,2	3,7	204,0	0,456
D+60	AP	8	44,1	0,0	110,5	
	NAP	10	20,5	0,0	202,8	0,965
D+100	AP	10	55,9	14,7	94,1	
	NAP	11	28,5	0,7	101,2	0,114
D+180	AP	10	49,0	8,5	73,2	
	NAP	8	49,6	2,7	468,3	0,965
D+270	AP	10	57,1	15,2	181,4	
	NAP	8	41,1	0,3	81,0	0,315
D+360	AP	10	36,4	18,8	315,4	
	NAP	8	57,2	8,9	109,6	0,633

Variável/ μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD3+CD16+56+						
PRÉ	AP	11	35,4	1,0	165,3	0,295
	NAP	9	82,2	28,5	128,0	
D+30	AP	12	24,3	0,9	119,0	0,211
	NAP	11	29,5	10,2	730,3	
D+60	AP	11	76,9	5,2	1479,4	0,562
	NAP	11	87,1	1,9	152,6	
D+100	AP	10	90,2	10,1	300,8	0,654
	NAP	11	67,4	23,8	190,2	
D+180	AP	10	101,1	16,5	983,7	0,756
	NAP	11	127,4	43,7	206,4	
D+270	AP	11	156,8	18,8	979,3	0,863
	NAP	10	134,5	21,5	445,0	
D+360	AP	11	112,3	31,6	1406,5	0,605
	NAP	10	92,7	27,2	340,0	

Variável/ μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD3-CD16+56+						
PRÉ	AP	11	60,2	1,0	544,7	0,201
	NAP	9	117,4	15,0	200,1	
D+30	AP	12	189,9	39,6	979,3	0,211
	NAP	11	153,9	17,6	552,0	
D+60	AP	11	307,6	57,8	684,8	0,652
	NAP	11	222,1	11,9	896,1	
D+100	AP	11	160,9	33,0	367,9	0,898
	NAP	11	198,6	16,7	493,7	
D+180	AP	10	155,5	57,1	390,2	0,973
	NAP	11	151,5	45,5	659,1	
D+270	AP	11	232,4	75,4	1038,4	0,756
	NAP	10	179,8	56,4	622,5	
D+360	AP	11	160,6	79,1	649,2	1,000
	NAP	10	181,9	77,4	684,2	

Variável/ μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD19+						
PRÉ	AP	11	60,9	0,7	1758,4	0,201
	NAP	9	137,5	14,6	572,7	
D+30	AP	12	4,7	0,0	44,1	0,347
	NAP	11	7,4	0,0	497,8	
D+60	AP	11	132,8	4,6	359,1	0,699
	NAP	11	32,1	2,8	444,8	
D+100	AP	11	112,6	5,8	315,9	0,847
	NAP	11	95,1	1,4	408,4	
D+180	AP	10	153,5	21,4	381,7	0,973
	NAP	11	114,8	0,9	1075,9	
D+270	AP	11	280,7	18,8	870,1	0,756
	NAP	10	267,7	81,5	913,8	
D+360	AP	11	235,5	42,1	367,5	0,512
	NAP	10	287,1	71,8	1023,3	

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD19+CD20+						
PRÉ	AP	11	56,0	0,7	1621,5	0,261
	NAP	9	111,2	14,4	566,3	
D+30	AP	12	4,1	0,0	43,8	0,288
	NAP	11	4,7	0,0	496,5	
D+60	AP	11	128,3	4,6	347,3	0,699
	NAP	11	27,3	2,8	425,3	
D+100	AP	11	111,0	5,8	310,6	0,898
	NAP	11	88,9	1,4	393,1	
D+180	AP	10	145,9	15,3	379,7	0,863
	NAP	11	106,5	0,9	1044,6	
D+270	AP	11	277,1	17,4	867,0	0,756
	NAP	10	262,8	80,7	903,6	
D+360	AP	11	233,2	29,2	358,4	0,605
	NAP	10	282,0	71,8	992,9	

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD19+CD10+						
PRÉ	AP	11	0,4	0,0	15,2	0,230
	NAP	9	2,4	0,0	36,9	
D+30	AP	12	0,4	0,0	3,6	0,288
	NAP	11	0,7	0,0	80,1	
D+60	AP	11	6,7	0,0	117,3	0,300
	NAP	11	4,0	0,0	16,6	
D+100	AP	11	9,7	0,0	51,1	0,519
	NAP	11	7,8	0,0	119,7	
D+180	AP	10	11,5	3,4	43,4	0,029
	NAP	11	1,6	0,0	34,0	
D+270	AP	11	19,0	2,0	52,7	0,863
	NAP	10	10,9	1,5	91,2	
D+360	AP	11	18,0	0,6	69,8	0,973
	NAP	10	13,2	2,3	81,0	

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD27+45RO+4+						
PRÉ	AP	11	28,0	3,2	2076,0	0,152
	NAP	9	109,5	48,5	489,7	
D+30	AP	12	0,5	0,0	79,2	0,091
	NAP	11	4,9	0,0	255,4	
D+60	AP	11	0,4	0,0	97,9	0,076
	NAP	11	4,3	0,0	110,8	
D+100	AP	11	2,5	0,3	363,3	0,243
	NAP	11	15,2	0,5	410,4	
D+180	AP	10	43,0	0,0	212,1	0,173
	NAP	11	121,4	1,2	438,3	
D+270	AP	11	150,4	2,0	422,0	0,705
	NAP	10	154,6	2,8	748,8	
D+360	AP	11	245,2	1,1	452,5	0,973
	NAP	10	167,7	13,3	810,6	

Variável μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD27+45RO+4+						
PRÉ	AP	11	99,3	1,5	625,1	
	NAP	9	126,7	52,3	295,4	0,331
D+30	AP	12	28,4	1,2	458,8	
	NAP	11	100,2	5,9	707,6	0,104
D+60	AP	11	106,5	18,7	208,8	
	NAP	11	82,2	23,8	280,6	0,847
D+100	AP	11	94,8	22,9	226,2	
	NAP	11	76,5	8,6	410,4	1,000
D+180	AP	10	136,5	76,9	174,5	
	NAP	11	82,1	43,7	306,9	0,085
D+270	AP	11	204,9	103,0	287,4	
	NAP	10	130,2	12,4	278,6	0,223
D+360	AP	11	231,3	92,1	311,1	
	NAP	10	147,2	83,2	306,2	0,387

Variável μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD27-45RO+4+						
PRÉ	AP	11	20,8	0,1	48,4	
	NAP	9	19,5	7,4	52,0	0,656
D+30	AP	12	11,8	1,0	138,3	
	NAP	11	26,2	7,9	123,5	0,169
D+60	AP	11	60,4	22,6	289,4	
	NAP	11	42,6	11,8	448,1	0,519
D+100	AP	11	64,5	11,9	259,3	
	NAP	11	52,8	1,8	257,3	0,898
D+180	AP	10	91,8	1,2	251,0	
	NAP	11	54,8	16,9	182,2	0,468
D+270	AP	11	79,6	50,8	190,2	
	NAP	10	62,6	30,8	229,6	0,197
D+360	AP	11	92,4	18,0	830,7	
	NAP	10	115,5	10,3	352,9	0,809

Variável μL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD27-CD45-4+						
PRÉ	AP	11	0,9	0,1	15,2	
	NAP	9	0,6	0,0	5,4	0,295
D+30	AP	12	0,5	0,0	6,1	
	NAP	11	1,8	0,0	35,1	0,190
D+60	AP	11	1,4	0,1	14,1	
	NAP	11	0,9	0,2	46,9	0,652
D+100	AP	11	1,3	0,2	10,7	
	NAP	11	2,6	0,1	47,5	0,193
D+180	AP	10	2,8	0,8	35,3	
	NAP	11	4,0	1,3	101,1	0,314

D+270	AP	11	3,0	1,5	52,1	0,756
	NAP	10	2,9	1,4	40,9	
D+360	AP	11	6,5	1,4	59,5	0,705
	NAP	10	9,5	0,6	65,9	

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD27+45RO-8+						
PRÉ	AP	11	42,7	0,0	389,7	0,710
	NAP	9	174,3	0,0	358,0	
D+30	AP	12	8,1	0,0	152,6	0,525
	NAP	11	11,5	0,0	615,0	
D+60	AP	11	9,7	0,0	276,6	0,606
	NAP	11	24,1	0,0	279,9	
D+100	AP	11	11,3	0,0	450,2	0,401
	NAP	11	25,9	0,0	322,3	
D+180	AP		1,5	0,0	42,5	0,016
	NAP	11	37,0	1,9	342,8	
D+270	AP	11	44,9	0,0	583,1	0,314
	NAP	10	13,8	0,0	351,8	
D+360	AP	11	9,7	0,0	423,2	0,809
	NAP	10	8,6	0,5	474,4	

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD27+45RO+8+						
PRÉ	AP	11	47,1	1,1	1584,7	0,331
	NAP	9	138,8	12,1	776,7	
D+30	AP	12	36,5	5,9	195,2	0,069
	NAP	11	102,5	15,0	1178,4	
D+60	AP	11	149,8	12,9	994,6	0,562
	NAP	11	236,0	9,4	1570,6	
D+100	AP	11	158,7	12,5	389,9	0,699
	NAP	11	121,4	11,1	385,5	
D+180	AP	10	173,3	25,1	395,9	0,387
	NAP	11	238,5	92,4	675,1	
D+270	AP	11	173,6	32,4	334,3	0,705
	NAP	10	195,0	82,4	668,7	
D+360	AP	11	243,0	7,4	622,0	0,809
	NAP	10	197,1	97,8	620,6	

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD27-45RO+8+						
PRÉ	AP	11	9,4	0,0	232,4	0,230
	NAP	9	27,1	2,0	81,7	
D+30	AP	12	5,7	0,4	136,7	0,059
	NAP	11	27,1	5,5	420,1	
D+60	AP	11	122,8	1,5	1260,2	0,748
	NAP	11	137,7	4,6	1972,6	

D+100	AP	11	216,2	12,0	1410,4	
	NAP	11	206,1	11,6	508,7	1,000
D+180	AP	10	341,1	10,3	1259,0	
	NAP	11	254,3	37,2	681,4	0,705
D+270	AP	11	424,4	10,7	1583,4	
	NAP	10	305,2	68,3	884,9	0,918
D+360	AP	11	522,4	17,7	6895,1	
	NAP	10	457,6	19,6	1156,4	0,918

Variável μ L	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD27-45RO-8+						
PRÉ	AP	11	1,1	0,0	452,8	
	NAP	9	3,7	0,0	44,1	1,000
D+30	AP	12	3,5	0,2	397,7	
	NAP	11	9,9	0,0	469,6	0,449
D+60	AP	11	34,0	0,4	214,6	
	NAP	11	36,1	0,0	2056,0	0,949
D+100	AP	11	20,0	0,0	460,9	
	NAP	11	53,3	0,0	738,3	0,300
D+180	AP	10	2,4	0,0	156,0	
	NAP	11	127,9	1,7	480,3	0,010
D+270	AP	11	38,5	0,0	1034,3	
	NAP	10	23,6	0,0	636,3	0,756
D+360	AP	11	7,4	0,3	1539,3	
	NAP	10	33,5	0,4	1556,6	0,223

Variável μ L	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD57+28-4+						
PRÉ	AP	9	0,1	0,0	1,2	
	NAP	7	0,2	0,0	1,5	1,000
D+30	AP	11	0,0	0,0	0,8	
	NAP	9	0,1	0,0	0,9	0,295
D+60	AP	11	1,9	0,0	10,3	
	NAP	8	0,4	0,0	1,3	0,012
D+100	AP	11	1,3	0,0	4,3	
	NAP	9	0,6	0,0	4,7	0,331
D+180	AP	9	2,0	0,0	26,1	
	NAP	10	1,8	0,0	8,9	0,497
D+270	AP	11	6,0	0,0	51,2	
	NAP	10	2,4	0,0	56,6	0,973
D+360	AP	11	4,2	0,3	79,9	
	NAP	10	6,2	0,0	276,4	0,557

Variável μ L	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD57+28-8+						
PRÉ	AP	9	4,0	0,0	25,2	
	NAP	7	9,7	2,6	37,0	0,210

D+30	AP	11	4,4	0,0	18,1	
	NAP	9	10,2	1,1	202,5	0,067
D+60	AP	11	66,2	0,3	288,6	
	NAP	8	45,5	20,8	160,2	1,000
D+100	AP	11	54,1	0,4	454,4	
	NAP	9	64,9	10,2	453,4	0,503
D+180	AP	9	113,2	1,9	362,9	
	NAP	10	169,5	12,7	650,7	0,156
D+270	AP	11	102,9	1,9	504,0	
	NAP	10	171,0	10,7	795,0	0,251
D+360	AP	11	89,2	7,7	4722,8	
	NAP	10	154,1	11,3	1697,6	0,557

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD95+CD19+						
PRÉ	AP	10	1,6	0,0	23,2	
	NAP	9	4,3	0,0	528,3	0,661
D+30	AP	10	0,7	0,0	3,1	
	NAP	10	0,1	0,0	3,4	0,353
D+60	AP	10	1,6	0,0	5,2	
	NAP	11	1,6	0,0	20,8	0,756
D+100	AP	11	1,8	0,0	5,1	
	NAP	11	2,5	0,0	8,5	0,606
D+180	AP	10	3,0	0,3	21,6	
	NAP	10	2,9	0,0	60,0	0,631
D+270	AP	11	5,2	0,1	11,4	
	NAP	10	2,6	0,0	9,1	0,282
D+360	AP	11	5,4	0,0	9,6	
	NAP	10	5,5	1,6	36,1	0,654

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD95+CD3+						
PRÉ	AP	11	53,4	0,5	134,7	
	NAP	9	76,4	21,3	190,6	0,230
D+30	AP	11	19,7	0,7	265,0	
	NAP	11	59,2	1,5	188,6	0,040
D+60	AP	10	99,8	5,6	251,3	
	NAP	11	79,8	8,0	789,0	0,654
D+100	AP	11	65,6	15,6	167,4	
	NAP	11	81,8	2,9	199,7	0,519
95+3+ D+180	AP	10	83,7	23,0	326,5	
	NAP	11	80,7	32,0	688,9	0,973
95+3+ D+270	AP	11	86,3	17,8	158,8	
	NAP	10	62,5	11,8	281,4	0,512
95+3+ D+360	AP	11	81,4	38,9	222,3	
	NAP	10	102,9	15,9	314,9	0,314

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD178+CD19+						
PRÉ	AP	7	0,7	0,5	7,1	0,710
	NAP	7	1,7	0,0	13,1	
D+30	AP	8	0,2	0,1	2,1	0,189
	NAP	7	1,7	0,0	4,5	
D+60	AP	9	1,7	0,3	124,7	0,423
	NAP	8	2,2	0,1	3,8	
D+100	AP	11	1,1	0,0	52,6	0,824
	NAP	9	2,1	0,6	8,6	
D+180	AP	10	1,3	0,1	7,7	0,243
	NAP	9	2,8	1,1	50,6	
D+270	AP	11	3,5	0,0	15,2	0,112
	NAP	9	11,1	0,9	64,5	
D+360	AP	11	7,3	0,0	102,5	0,468
	NAP	10	4,2	0,0	16,5	

Variável µL	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
CD178+CD3+						
PRÉ	AP	8	8,0	0,1	22,3	0,779
	NAP	7	6,8	0,0	75,9	
D+30	AP	9	4,1	0,0	44,3	0,481
	NAP	8	5,7	0,0	153,9	
D+60	AP	9	43,8	0,0	385,6	0,481
	NAP	8	4,2	0,3	145,0	
D+100	AP	11	38,3	2,2	182,4	0,025
	NAP	9	12,3	0,0	40,7	
D+180	AP	10	14,1	1,3	72,6	0,218
	NAP	10	41,5	0,0	136,9	
D+270	AP	11	18,1	2,5	153,5	0,201
	NAP	9	36,6	6,0	1153,1	
178/3 D+360	AP	11	67,9	0,3	492,6	0,512
	NAP	10	13,4	0,0	375,2	

Variável	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de P
178953 PRÉ	AP	7	0,1	0,0	5,0	0,383
	NAP	7	1,4	0,0	17,9	
178953 D+30	AP	8	0,2	0,0	0,8	0,779
	NAP	7	0,2	0,0	1,9	
178953 D+60	AP	9	0,7	0,0	133,2	0,481
	NAP	8	0,2	0,0	22,4	
178953 D+100	AP	11	0,6	0,0	7,6	0,552
	NAP	9	0,7	0,0	9,4	
178953 D+180	AP	10	1,3	0,0	3,5	0,356
	NAP	9	2,9	0,0	5,5	
178953 D+270	AP	11	1,4	0,0	19,9	0,603
	NAP	9	4,6	0,0	8,6	
178953 D+360	AP	11	1,1	0,0	5,7	0,051
	NAP	10	4,4	0,0	9,3	

Variável	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD25^{fo}127^{IR} μL						
PRÉ	AP	11	2,4	0,3	28,6	0,295
	NAP	9	4,4	2,1	13,0	
D+30	AP	12	2,6	0,3	47,9	0,928
	NAP	11	2,4	0,0	25,4	
D+60	AP	11	3,7	0,1	20,4	0,699
	NAP	11	4,0	1,3	15,5	
D+100	AP	11	8,4	1,1	30,1	0,797
	NAP	11	5,6	0,7	26,8	
D+180	AP	10	4,5	1,4	27,5	0,387
	NAP	11	6,9	1,8	20,0	
D+270	AP	11	8,4	4,7	54,2	0,918
	NAP	10	8,0	2,1	39,9	
D+360	AP	11	9,1	3,6	30,8	0,314
	NAP	10	5,4	1,0	37,7	

Variável	Doador	n	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>P</i>
CD25^{fo}GITR+ μL						
PRÉ	AP	9	1,8	0,8	9,6	0,114
	NAP	7	3,9	1,7	7,4	
D+30	AP	10	1,3	0,1	7,9	0,314
	NAP	11	2,9	0,4	21,5	
D+60	AP	10	4,0	0,5	21,1	1,000
	NAP	11	4,0	2,3	5,3	
D+100	AP	10	3,8	0,8	25,0	0,579
	NAP	10	3,8	2,7	11,6	
D+180	AP	10	4,7	0,4	27,5	0,796
	NAP	10	4,9	1,1	16,3	
D+270	AP	11	6,8	4,1	23,2	0,197
	NAP	10	5,1	1,6	22,2	
D+360	AP	11	6,6	3,1	36,2	0,223
	NAP	10	5,5	1,0	21,1	

APÊNDICE B – Análise comparativa dos grupos definidos pelo DECH e Análise estatística

Análise comparativa dos grupos definidos pelo DECH

Em cada momento de avaliação (amostra pré, D+30, D+60, D+100, D+180, D+270 e D+360), para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais para os dois grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Nas tabelas abaixo são apresentadas estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos.

Também é apresentada uma tabela com os valores de cada variável para o caso com DECH agudo que foi a óbito e para o caso que não teve a pega do transplante.

Análise estatística

Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas, foi considerado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

ANEXOS

ANEXO 1 – Immune Reconstitution in Fanconi Anemia Patients Following Allogeneic Bone Marrow Transplantation

IMMUNE RECONSTITUTION IN FANCONI ANEMIA PATIENTS FOLLOWING ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION

Miriam Perlingeiro Beltrame^{1*}, Mariester Malvezzi¹, Carmem Bonfim², Dimas Tadeu Covas³, Alberto Orfao⁴, Ricardo Pasquini⁵

¹Service of Flow Cytometry, Clinics of Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil. ²Pediatric Bone Marrow Transplantation Division, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. ³Regional Blood Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil. ⁴Cancer Research Center (IBMCC-CSIC/USAL), Department of Medicine, Cytometry Service and IBSAL, University of Salamanca, Salamanca, Spain. ⁵ Hematology Division, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Corresponding author:

Miriam Perlingeiro Beltrame, 1Service of Flow Cytometry, Clinic of Hospital, Federal University of Paraná, Rua Padre Camargo 280

80060240 – Curitiba - PR

E-mail address: mbeltrame@ufpr.br, Phone/Fax: 554133607998

ABSTRACT

Background. Fanconi anemia is an autosomal recessive or X-linked genetic disorder characterized by bone marrow (BM) failure/aplasia. Failure of hematopoiesis results in depletion of the BM stem cell reservoir, which leads to severe anemia, neutropenia and thrombocytopenia, frequently requiring therapeutic interventions including hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Successful BMT requires reconstitution of normal immunity.

Methods. In the present study, we performed a detailed analysis of the distribution of peripheral blood subsets of T, B and NK lymphocytes in 23 patients with Fanconi anemia

before and after BM transplantation (at days D+30, D+60 and D+100, D+180 D+270 and D+360). In parallel, we also compared the patients groups who received related and unrelated bone marrow, pre and one year after BMT.

Results. After transplantation, we found different kinetics of recovery for the distinct major lymphocyte subsets. NK cells were the first to recover, followed by cytotoxic CD8⁺ T-cells and B-cells, and then the CD4⁺ T-helper cells. Early recovery was at the expense of memory cells which would therefore be potentially derived from the graft whereas, recent thymic emigrant (CD31⁺ CD45RA⁺) and naive CD4⁺ or CD8⁺ T-cells, rose only 6 months after HSCT, in the presence of immunosuppressive graft-vs-host disease (GVHD) prophylactic agents. While only slight differences were observed in the early recovery of cytotoxic CD8⁺ T-cells among cases receiving a graft from related vs. unrelated donors, cases suffering from GVHD displayed a markedly delayed recovery of NK-cells and B-cells as well as of Tregs and early thymic emigrant and total CD4⁺ T-cells.

Conclusions. Overall, our results support the utility of post-transplant vigilance of peripheral blood lymphoid subsets, for improved monitoring and follow-up of Fanconi anemia patients undergoing BMT.

Key words: Bone marrow, Fanconi anemia, Immune system, Transplantation

Running title: Immune system in transplanted FA patients

INTRODUCTION

Proliferation and maturation of blood cells are tightly regulated processes which involve a relatively large number of growth factors and cytokines (1,2). In addition, the bone marrow (BM) stroma, which comprises vascular and stromal cells, is critical to provide the ideal microenvironment for proper hematopoiesis (3). Therefore, changes in cytokine levels and/or the hematopoietic microenvironment may lead to an altered hematopoiesis, including BM aplasia (4). Fanconi Anemia (FA) is an inherited disease characterized by BM failure (5). FA patients have a defect in DNA repair which progressively leads to the accumulation of chromosomal and genetic alterations. Apart from anemia, FA patients display congenital malformations, deafness and skin hyper-pigmentation (e.g. "café au lait" spots), among other symptoms (6). Regarding outcome, FA is an unpredictable disease, with some patients developing leukemia and solid tumors at different stages in life (7). Among the available therapeutic options, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the most effective since it improves the chance of patients to survive longer (8-12). One of the major caveats associated with HSCT is the transient immune deficiency state that follows transplantation, which is associated with significant patient morbidity and mortality (13). The duration and severity of this phase varies according to graft manipulation, choice of graft type,

development of graft-versus-host disease, and level of residual thymic activity, among other variables (14,15).

Assessment of lymphocyte-associated markers has been shown to be an invaluable tool in the clinical setting, and is currently under research use for the following purposes: i) to monitor response of FA patients to therapy, ii) to measure disease activity, and iii) to predict for chronic graft-versus-host disease (GVHD) (16-19). Successful allogeneic HSCT (allo-HSCT) requires reconstitution of normal T-cell immunity; key factors involved in this process include, the thymic activity of the recipient of the HSCT, biologic features of the allograft (e.g degree of histocompatibility, infused donor T cells) and preparative regimens. For this reason specific suppression allo-reactive T-cells, without inhibiting the entire T-cell repertoire is an important goal of transplantation immunology (20-22).

In order to better understand the kinetics of immune reconstitution in FA children following allogeneic BM transplantation (BMT), and to identify potential factors associated with normal vs altered immune recovery, here we investigated the number and phenotype of circulating T, B and NK cells and their subsets, in blood samples from 23 FA patients who underwent allogeneic BMT after a myeloablative conditioning regimen.

PATIENTS AND METHODS

Patients

A total of 23 FA patients (12 males and 11 females with ages varying from 4 to 21 years) who underwent allogeneic BMT between 2009 and 2011, we studied. All subjects gave their informed consent prior to entering the study, and it was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Paraná - Clinic Hospital (Curitiba, Brazil). Twelve patients (52%) received a transplant from related donors, while in the other cases (48%) the graft had an unrelated origin. In terms of conditioning regimen, the group that received a BMT from related donors were treated with cyclophosphamide (60mg/Kg) alone, whereas those patients that received a BMT from an unrelated origin were treated with cyclophosphamide in combination with fludarabine (125mg/m²) and thymoglobulin (5mg/Kg). In both groups immunoprophylactic treatment consisting of cyclosporine and methotrexate (Table 1) was given for a mean time of 12 months (range: 4 to 22 months). Successful engraftment was observed in 21 of the 23 patients (91%). Patients were followed for a minimum period of one year (up to 5 years). Overall, 13 patients had acute (n=5) and/or

chronic (n=8) GVHD. Causes of death occurring in two of these patients consisted of, acute GVHD (aGvHD) in one patient on day +30, and rejection 375 days after the transplant in another patient (Table 1). Complete chimerism was defined, when 100% donor cells were detected indicating complete hematopoietic replacement; in turn, mixed chimerism was defined when host cells were detected within specific cell population (e.g. the lymphocytes), at percentile $\geq 10\%$ and $\leq 95\%$ of all cells (Table I), and it did not influence therapy. None of the patients received Rituximab or T depleting treatments.

Multi parameter flow cytometry analysis of lymphocyte subsets

Peripheral blood (PB) samples was collected into tubes containing 7.5% K3 EDTA for both flow cytometry and complete blood cell (CBC) count analysis (ADVIA 2120, Siemens, NY, USA); cell morphology was assessed visually using conventional microscopy. Additionally, plasma samples were also collected for the evaluation of serum cytokine levels, as described below.

Flow cytometry characterization of PB lymphocytes was performed using conventional stain-and-then-lyse sample preparation techniques. Briefly, 100 μ l of fresh PB was incubated for 15 min at room temperature in the dark, with pre-titrated saturating amounts of 4-color combinations of fluorochrome conjugated monoclonal antibodies (MAb) - FITC, PE, PerCP, APC - (Table 2). For every PB sample, an additional aliquot containing unstained sample were processed in parallel as negative control. Afterward, non-nucleated cells were lysed using FACS Lysing solution BD (Becton & Dickinson Biosciences; San Jose, CA, USA) according to the instructions of the manufacturer, and cells were then centrifuged and washed twice in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4). Intracellular FOXP3 staining was performed with the Fix&Perm (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) reagent kit after staining for cell surface membrane markers, following the recommendations of the manufacturer.

Data acquisition was performed in a FACSCalibur flow cytometer (BD) immediately after sample preparation was completed. For each sample aliquot, a minimum of 100,000 events was acquired using the CellQUEST software (BD). For data analysis, the Infinicity software program (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used.

Absolute lymphocyte counts were calculated using a dual platform approach by multiplying the percentage of each lymphocyte subset obtained in the flow cytometry analysis and the absolute leukocyte count obtained in an ADVIA 2120 hematology analyzer; for that specific PB sample. The following lymphocyte subsets were specifically identified: CD3+ (T

lymphocytes), CD3+CD4+ (T helper cells), CD3+CD8+ (cytotoxic T cells), CD4+CD45RA+CD31+ (new thymic emigrant T lymphocytes), CD57+CD28-CD4+ or CD8+ (replicative senescent T cells), CD27+CD45RO-CD4+ or CD8+ (naive T cells), CD27+CD45RO+CD4+ or CD8+ (central memory T cells), CD27-CD45RO+CD4+ or CD8+ (effector T cells), CD27-CD45RO-CD4+ or CD8+ (late effector T cells), CD3+CD69+ (activated T cells) and CD45^{high}SSC^{low}CD19-CD3-CD69+ activated non-T, non-B lymphocytes (NK cells), CD4+CD25^{high}CD127^{low}FOXP3+ (regulatory T cells; Tregs), CD4+CD25^{high}GITR+FOXP3+(Tregs), CD3+CD16+and/or CD56+ (NK/T lymphocytes), CD3+TCR+ (TCR-Tcells), CD3+TCR+ (TCRT-Tcells), CD19+CD20+ (mature B lymphocytes), CD19+CD10+ (immature B lymphocytes) and CD3-CD16+CD56+ (NK cells). In addition, we also determined the number of T and B cells expressing Fas (CD95) and FasL (CD178): CD3+Fas+, CD3+FasL+, CD19+Fas+, and CD19+FasL+, respectively.

Statistical methods

To evaluate the statistical significance of differences observed between groups, non-parametric Wilcoxon and the Mann-Whitney tests were used and P values ≤ 0.05 were considered statistically significant (Statistica v.8.0 software - Stat Soft, OK, USA).

RESULTS

One of the major risks associated with HSCT is the transient immune deficiency state that follows transplantation and that leads to significant patient morbidity and mortality (13). Overall, CD3-CD56+ NK cells were the first lymphoid cells to emerge following BMT, followed by CD3+CD8+ cytotoxic T cells, CD19+ B cells and, finally, CD3+CD4+ helper T cells. Below, the kinetics observed for each of these specific lymphoid subsets is described in more detail.

Recovery of T cell subsets after allo-BMT

The overall number of total T cells was significantly decreased after transplantation. Pre-transplant levels were restored only by month +3 (day + 100) following BMT. However, distinct kinetics were observed for the different T cell subsets. For instance, we found a faster increase in the numbers of CD3+CD8+ cytotoxic T cells, which reached pre-transplant values at day+60, remaining stable thereafter (Figures 1A to Figure 1E). Conversely, CD3+CD4+ T

helper cells only reached pre transplant levels at day +180 (Figure 1B), increasing significantly thereafter. Identical recovery kinetics were observed for CD3+CD4-CD8- T cells (Figure 1D) and TCR+ T lymphocytes (data not shown). Of note, PB CD3+CD4-CD8- include both TCR+ and TCR+ T cells involved in natural immunity, some authors (23-25) suggesting that these cells may play an important role in the recovery of neutrophils associated with growth factors during the very early post-BMT period, as well as, at a later stage of BMT, in the immunodeficient state of chronic GVHD. On the other hand, CD3+CD4+CD8+ (CD4 and CD8 double positive) T-cells were already significantly increased at day +180 when compared to pre-transplant levels (Figure 1E). Interestingly, a significant decrease in the frequency of PB T cells displaying a newly thymic emigrant phenotype (CD31+CD45RA+), both within the CD4+ T helper and the CD8+ cytotoxic T cell compartment (Figures 2A and 2B). Such reduction lasted up to 3-4 months after transplantation, and it was followed by a steady expansion, reaching pre-transplant levels by day +270 (Figures 2A and 2B). As could be expected, a similar profile to that of the newly thymic emigrant T-cells was also observed for the CD4+CD27+CD45RO- naive T cells (Figure 2E), but not the naive CD8+ T-lymphocytes (Figure 2I). In turn, T cells expressing a replicative/senescent (CD4+CD57+CD28- or CD8+CD57+CD28-) phenotype were virtually undetectable before transplantation; however, these late stage effector T cells became first detectable by day+60, and they slowly and progressively increased through the following time points, particularly those T- cells with a CD8+CD57+CD28- phenotype (Figures 2C and 2D). A similar pattern to that of replicative/senescent late-effector cells was found for effector NK/T cells and for both memory effector (CD27-CD45RO+) and late effector (CD27-CD45RO-), CD4+ and CD8+ T-cells (Figure 2G, Figure 2H, Figure 2K and Figure 2L). Nevertheless while the numbers of both subsets of effector CD8 cells and of the memory effector CD4 T- cells were increased by day +60 after transplantation, terminal effector CD4+ T- cells showed a later recovery, being significantly increased only by day +180 after transplantation. Regarding CD27+CD45RO+CD4+ central memory T helper cells, there were no significant changes throughout the whole follow-up period (Figure 2F), while CD27+CD45RO+CD8+ central memory cytotoxic T-cell increased from day +180 (Figure 2J).

Despite all these changes, the overall number of CD69+ activated T cells, remained virtually unchanged after transplantation, except for the significantly decreased number observed at day +100 (Figure 2M). In turn, CD25^{high}CD127^{low}CD4+FOXP3+ (Figure 4N)

Tregs started to recover at day +60 after transplantation, reaching significantly increased numbers (double of pre-transplant values) from day +270 on ((Figure 2N).

Recovery of NK cells after allo-BMT

As mentioned above, NK cells peaked between day +30 and day +60, slightly decreasing thereafter towards values which were significantly increased vs. pre-transplant levels (Figure 3A). Similarly CD45^{high}SSC^{low}CD19-CD3-CD69⁺ NK- cells doubled their pre-transplant levels, already at day +30 and they continued to increase until the end of the study (Figure 3B).

Recovery of B lymphocytes after allo-BMT

Both the total B lymphocyte counts as well as the number of CD19⁺CD10⁺ immature and CD19⁺CD20⁺ mature e immature B cells almost disappeared at day +30; however, they slowly recovered thereafter (day +100 and day+60, respectively), reaching significantly increased values when compared to pre-transplant levels from day +180 and day +270 on, respectively (Figure 3C and Figure 3D). The CD19⁺CD24⁺CD38⁺, transitional human B lymphocyte population reached the initial pre-transplant values at day +60 after transplantation, and such values were maintained until the end of follow-up period (data not shown).

Expression of the CD95 and CD95L apoptosis-associated markers on T and B lymphocytes

No significant changes were observed throughout the study in terms of the number of CD95⁺ and CD95L⁺ (CD178) T lymphocytes (Figure 3E). In turn, the percentage of B lymphocytes (CD19⁺) coexpressing CD95 and CD178 was significantly increased from day +100 vs pre transplant levels (Figure 5F), although the mean number of B cells expressing apoptotic markers was always below 10cells/ μ L during this period (day+ 100 to day+ 360) (Figure 3F).

Immune reconstitution of FA patients receiving donor-related vs. donor-unrelated allo-BMT

Upon grouping FA patients according to the type of donor (e.g. related vs. unrelated donor), no statistically significant differences were found for most of the different subsets of lymphocytes analyzed at the distinct time points with a few exceptions (Figure 4). These

exceptions included the total numbers of: i) total CD3⁺ T cells (303±408 vs. 832±737x10⁶/L; p=0.02; Figure 4A), ii) TCRgd⁺ T lymphocytes (15±22 vs. 51±55 x10⁶/L; p=0.04; Figure 4F), iii) CD3⁺CD8⁺ (172±208 vs. 541±546 x 10⁶/L; p=0.03; Figure 4C), and iv) CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (14±21 vs. 54±54 x10⁶/L; p=0.03; Figure 4E) cytotoxic T cells. These cells were significantly higher at day +30 after transplantation among those patients receiving a BMT from a unrelated donor than related donors.

Immune reconstitution of FA patients with vs. without graft versus host disease

Upon grouping patients with vs. without GVHD, significant differences in the recovery of distinct cell populations were noted between day +60 and day +270. Thus, cases who suffered from a GVHD (acute and/or chronic GVHD) (n=8) showed a significantly delayed recovery of NK-cells and B lymphocytes that only reached similar values to those of patients who had no GVHD at day +360 (Table 5). In addition, recovery of CD4⁺ early thymic emigrant and total T cells as well as the raise of Tregs, was also delayed among cases with GVHD till day +270 (Table 5). One year after transplantation, day +360, no significant differences were observed between cases with and without GVHD (Table 5).

DISCUSSION

Immune reconstitution after HSCT is increasingly recognized as a critical determinant of morbidity and mortality from opportunistic infections as well as GVHD in HSCT recipients. Previous studies have shown that post-transplant T cells derive from both mature T cells present in the donor graft and T cells that develop de novo in the recipient, derived from transplanted donor hematopoietic stem cells (20). Whereas the former results in transient adoptive transfer of immunity, as well as GVHD, mediated by cells with alloreactivity towards recipient antigen determinants, the latter would lead to long-term immune reconstitution (21). Although B cells are known to be significantly decreased (or even undetectable) during the first 2 months after BMT, here we detected the presence, of immature CD19⁺CD10⁺ B cells early after transplantation (day +60) (21, 22).

In this study we describe in detail the immune reconstitution of PB lymphoid subsets in a relatively large series of FA patients that received a BMT from related and unrelated donors, and that were followed sequentially for a period of one year after transplantation. Although there is limited information about the immune recovery of FA patients after BMT,

overall similar results to those reported in other hematological malignancies were observed in our cases (reviewed in Porrata & Markovik, 2004; Peggs & Mackinnon 2004; Auletta & Lazarus (23-25). Overall, we found different kinetics of recovery after transplantation for the distinct major lymphocyte populations, also described by Zhu et al (26). NK cells were the first to recover, followed by cytotoxic CD8⁺ T cells and B cells, and finally, the CD4⁺ T helper cells. These results are in line with those observed for other maturation-associated subsets of lymphocytes. In fact, recent emigrant CD31⁺CD45RA⁺ (CD4⁺ or CD8⁺) and naive CD4⁺ T-cells, rose only 6 months after BMT, such increase occurring in the presence of immunosuppressive GVHD prophylactic agents. The parallel increase in recent thymic emigrant and naive CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻ T helper cells, suggests that the latter cells were not the expanded progeny of naive T cells present in the donor graft but that they rather corresponded to newly-produced T helper lymphocytes, as also found by Skert et al (27).

Expression of CD31⁺ on CD4⁺ T helper cells has been associated with higher intracellular levels of TRECs (T cell receptor excision circles), therefore representing an appropriate surrogate phenotypic marker to evaluate thymic reconstitution in lymphopenic subjects following HSCT (28, 29). In our series, this T cell subset was fully recovered 9 months after transplantation. Although release of new thymic emigrants has been detected 3 months after the transplant, several other groups only found these cells only around month +6 (30, 31). Such differences could be related to the use of different surrogate markers and phenotypes for the definition of recent thymic emigrants as in these earlier studies markers like CD44, CD45RB and CD62L instead of CD31, were used (32-25).

T cells expressing a CD57⁺CD28⁻CD4⁺ or CD8⁺ phenotype have been show to represent functionally senescent cells with low in vitro replication potential, reduced telomeres and an increased susceptibility to undergo apoptosis (36); overall these functional features correspond to end-stage terminal-effector T cells. In the transplantation settings, these cells have been reported to be increased in patients with GVHD and CMV infection (37-43). Unlike recent thymic emigrants, CD57⁺CD28⁻ senescent CD4⁺ and CD8⁺ T cells already increased early during follow-up, in parallel to the recovery of both memory effector and terminal effector CD8⁺ and also CD4⁺ T lymphocytes, as well as, cytotoxic TCR $\gamma\delta$ ⁺ and CD4⁻CD8⁻ T lymphocytes and NK/T cells. Such increase of cytotoxic and helper T- cells is potentially due to the activation and differentiation of memory cells, since, in contrast to CD4⁺ naive and new thymic emigrant T- cells, these terminal-effector cells showed neither decreased nor increased levels throughout the whole follow-up period (44-47). Altogether, these results suggest that early recovery of NK cells (including activated CD69⁺ NK cells)

and other cytotoxic T-cells (and potentially also B-lymphocytes) are at the expense of adoptive transfer of donor lymphocytes. In contrast, newly-produced CD3+CD4+ T helper cells would contribute to the recovery of the naive T cells compartment at latter time points. These results are in line with previous studies showing early recovery of NK cells such cells even representing the majority of all PB mononuclear cells early after transplantation (32, 33, 42, 44-47), whereas recovery of other B and T cell populations (particularly CD4+ T-cells) is substantially delayed, their number tending to remain low for up to 12 months, or even longer periods in patients that develop chronic GVHD (48,49). In contrast, the number of CD8+ cells usually returns to normal levels much faster (50), as also found here. Notably, Tregs were significantly increased from day +270 on. Tregs, particularly those coexpressing CD4+ and Foxp3+ play a key role in the maintenance of tolerance after allo-HSCT. Despite similar kinetics where found in FA patients receiving a BMT from related and unrelated donors, differences were observed on the timing of early recovery of total T-cells and CD8+ T-cells (earlier among unrelated donors), both cell populations reaching similar values in the two patient groups by day +100. Such differences may potentially be due to an increased T cell mediated allo-reactivity among patients receiving a BMT from unrelated vs related donors. Similarly, cases who had suffered from acute and/or chronic GVHD also showed a significantly delayed recovery of NK-cells and B-cells, as well as of thymic emigrant and total CD4+ T-cells, which only reached those values observed among the other transplanted FA patients after 9 and 12 months, depending on the specific cell population (NK-cells plus B-cells and both recently produced and total CD4+ T-lymphocytes, respectively). As previously suggested (51,52) in the allo-BMT setting, such delayed recovery could be directly related to the undergoing GVHD immunological response

In summary, in this study, which is based on the largest series of patients with FA undergoing BMT reported so far, we show that the kinetics of recovery of the different populations of lymphocytes, follows those patterns also described for patients with other hematological malignancies: early recovery of NK cells, followed by effector cytotoxic T-cells and B cells, and finally, CD4 T helper cells. Interestingly, early recovery appears to be due to the expansion of memory cells potentially derived from the graft, while at latter periods, recovery of recent thymic emigrants and naive T- cells indicates recovery of T cell production from the transplanted hematopoietic stem cells. In addition, they point out the existence of slight differences on the early recovery of cytotoxic T cells among cases receiving a graft from related vs unrelated donors, while clear differences existed among cases who showed GVHD vs all other patients, which points out the potential utility of post-

transplant monitoring of PB lymphoid subsets to improve the monitoring and follow-up of patients undergoing BMT. In this regard, monitoring the major NK, B and T-CD8+ cell subsets after day +60, together with the recent thymic emigrants and naive CD4+ T-helper cells, at days +100, +180 and +360 post-BMT, would be particularly informative.

REFERENCES

1. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003; 101:1249-1256.
2. Green AM, Kupfer GM. Fanconi Anemia. *Hematology Oncology Clinical North America*. 2009; 23:193-214.
3. Soulier J. Fanconi Anemia. *Hematology. American Society of Hematology Education Book*. 2011; 2011:492-497.
4. Shukla P, Ghosh K, Vundinti BR. Current and emerging therapeutic strategies for Fanconi anemia. *The HUGO Journal*. 2012; 6:1-8.
5. Svahn J, Dufour C. Fanconi anemia – learning from children. *Pediatric Reports*. 2011; 3:18-20.
6. Colin A, Sieff CA, Nisbet-Brown, Nathan DG. Congenital bone marrow failure syndromes. *British Journal of Haematology*. 2000; 111:30-42.
7. Medeiros, CR, Bitencourt MA, Zanis Neto J, Bonfim CS, Funke VM, Farah, Pasquini R. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an alternative stem cell source in Fanconi anemia patients: analysis of 47 patients from a single institution *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006; 39:1297-1304.
8. Dalle JH. HSCT for Fanconi anemia in children: factors that influence early and late results. *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 42: S51-S53.
9. Eiler ME, Frohnmayer D, Frohnmayer L, Larsen K, Olsen J EDS. 2008; *Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management*. 3 ed. Eugene, OR: Fanconi Anemia Research Fund, Inc. 2008; 32:33-46.
10. Myres KC, Davies SM. Hematopoietic stem cell transplantation for bone marrow failure syndromes in children. *Biology Blood Marrow Transplantation*. 2009; 15:279-292.
11. Pinto FO, Leblanc T, Chamousset D, Le Roux G, Brethon B, Cassinat B, Villartay JP, Stoppa-Lyonnet D, Baruchel, A, Socié G, Gluckman E, Soulier J. Diagnosis of Fanconi anemia in patients with bone marrow failure. *Haematologica* 2009; 94:487-495.

12. MacMillan M, Wagner JE. Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia – when and how? *British Journal of Haematology*. 2010; 149:14-21.
13. Schultz KR, Miklos DB, Fowler D, Cooke K, Shizuru J, Zorn E et al. Toward Biomarkers for Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. Biomarker Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006; 12:126-137.
14. Abrahamsen IW, Sømme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D, Tjønnfjord GE. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2005; 90: 86-93.
15. Locatelli F, Giorgiani G, Di-Cesare-Merlone A, Merli P, Sparta V, Moretta F. The changing role of stem cell transplantation in childhood. *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 41:S3-S7.
16. Soiffer R. Immune modulation and chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 42: S66-S69.
17. Sakaguchi S, Sakaguchi M, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*. 1995; 155:1151-64.
18. Teshima T, Ferrara JM. Understanding the alloresponse: New approaches to graft-versus-host disease prevention. 2002; *Seminars in Hematology*. 2002;39:15-22.
19. Quezada SA, Bennett K, Blazar BR, Rudensky AY, Sakaguchi S, Noelle RJ. Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154 induced graft tolerance: The interplay of clonal anergy and immune regulation. *The Journal of Immunology*. 2005;175: 2771-2779.
20. Vokaer B, Rompaey NV, Lemaitre PH, Lhommé F, Kubjak C, Benghiat FS, et al. Critical Role of Regulatory T Cells in Th17-Mediated Minor Antigen-Disparate Rejection. *The Journal of Immunology*. 2010; 185: 3417-3425.
21. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009; 373:1550-1561.
22. Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, Bergwelt-Baildon MS. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009; 114: 4919-4927.
23. Porrata LF, Markovik SN. Timely reconstitution of immune competence affects clinical outcome following autologous stem cell transplantation. *Clinical and Experimental Medicine*. 2004; 4:78-85.
24. Peggs K, Mackinnon S. Immune reconstitution following haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology*. 2004; 124: 407-420.
25. Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplantation*. 2005; 35: 835-857.

26. Zhu J, Yamane H, William EP. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*. 2010; 28: 445-489.
27. Skert C, Damiani D, Michelutti A, Patriarca F, Arpinati M, Fili C, et al. Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study. *Bone Marrow Transplantation*. 2009; 44: 729-737.
28. Ye P, Kirschner DE. Reevaluation of T Cell Receptor Excision Circles as a Measure of Human Recent Thymic Emigrants. *Journal of Immunology*. 2002;169: 4968–4979.
29. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell. *Blood*. 2009; 113: 769-774.
30. Storek J, Storb R. T-cell reconstitution after stem-cell transplantation—by which organ? *Lancet*. 2000; 355: 1843-1844.
31. Fallen PR, McGreavey L, Madrigal JA, Potter M, Ethell M, Prentice HG, A Guimarães, Travers PJ. Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*. 2003; 32:1001-1014.
32. Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naïve T Cells Transiently Acquire a Memory-like Phenotype during Homeostasis-driven Proliferation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192 (4): 557-564.
33. Jameson S. Maintaining the Norm: T-Cell Homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2:547-556.
34. Zaho C, Davies JD. A peripheral CD4+ T cell precursor for naive, memory, and regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010; 207:2883-2894.
35. Fallen PR, Duarte RF, McGreavey L, Potter M, Ethell M, Prentice HG, et al. Identification of non-naive CD4+CD45RA+ T cell subsets in adult allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*. 2003; 32:609-616.
36. Brenchley JM, Karandicar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8 + T cells. *Blood*. 2003; 101:2711-2720.
37. Wang ECY, Wiedeman JT, Perera P, Fisher J, Borysiewicz LK. Subsets of CD8 +, CD57+ cells in normal, healthy individuals: correlations with human cytomegalovirus (HCMV) carrier status, phenotypic and functional analyses. *Clinical & Experimental Immunology*. 1993; 94: 297-305.
38. Pawelec G, Ouyang Q, Colonna-Romano G, Candore G, Lio D, Caruso C. Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for immunological risk phenotypes. *Trends in Immunology*. 2002; 23: 330-332.
39. Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell

- transplantation in multiple sclerosis patients. *Journal of Experimental Medicine*. 2005; 201: 805-816.
40. Effros RB, Dagarag M, Spauding C, Man J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Nature Immunology Reviews*. 2005; 205:147-157.
41. Mendes AV, Kallas EG, Benard G, Pannuti CS, Menezes R, Dulley FL, et al. Impact of cytomegalovirus and graft versus host disease on the dynamics of CD57+CD28-CD8+ T cells after bone marrow transplant. *Clinics*. 2008; 63: 667-676.
42. Szabolcs P, Niedzwiecki D. Immune Reconstitution in Children After Unrelated Cord Blood Transplantation. *Cytotherapy*. 2007; 9 (2): 111-122.
43. Szabolcs P. The immunobiology of cord blood transplantation. *The Korean Journal of Hematology*. 2010; 45: 224-235.
44. Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, Kanda Y, Tanaka Y, Ogawa S, et al. Recovery of Va24p NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2004; 34: 595-602.
45. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyns H. Complementary and contrasting exroles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011; 90:49-60.
46. Storek J, Gooley T, Witherspoon RP, Sullivan KM, Storb R. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *American Journal of Hematology*. 1997; 54:131-138.
47. Farias, KM. Analysis of immune reconstitution in type 1 diabetes and multiple sclerosis patients following hematopoietic stem cell transplantation. 2006. 286p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
48. Klein C, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Jabado N, Benkerrou M, Blanche S, et al. Bone Marrow Transplantation in Major Histocompatibility Complex Class II Deficiency: A Single-Center Study of 19 Patients. *Blood*. 1995; 85: 580-587.
49. Fedele R, Martino M, Garreffa C, Messina G, Console G, Princi D, et al. The impact of early CD4+ lymphocyte recovery on the outcome of patients who undergo allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Transfusion*. 2012; 10:174-180.
50. Jiang YZ, Barret AJ, Goldman JM, Mavroudis DA. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft versus-leukemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Annals of Hematology*. 1997; 74:1-6.
51. Mohty M, Apperley JF. Long-Term Physiological Side Effects After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Hematology. American Society Hematology Book*. 2010, 229-236.
52. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*; 2010; 115: 4293-301.

Conflicts of interest

Authors declare that they have no conflicts of interest. The authors are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Rita Perlingeiro for critical of the manuscript. We thank all personnel from the immunophenotype and biochemistry laboratories, the nursing team from the Bone Marrow Transplantation Unit and Maira Santana (BD technical support) and the biology student of UFPR Luana Wunsche de Almeida.

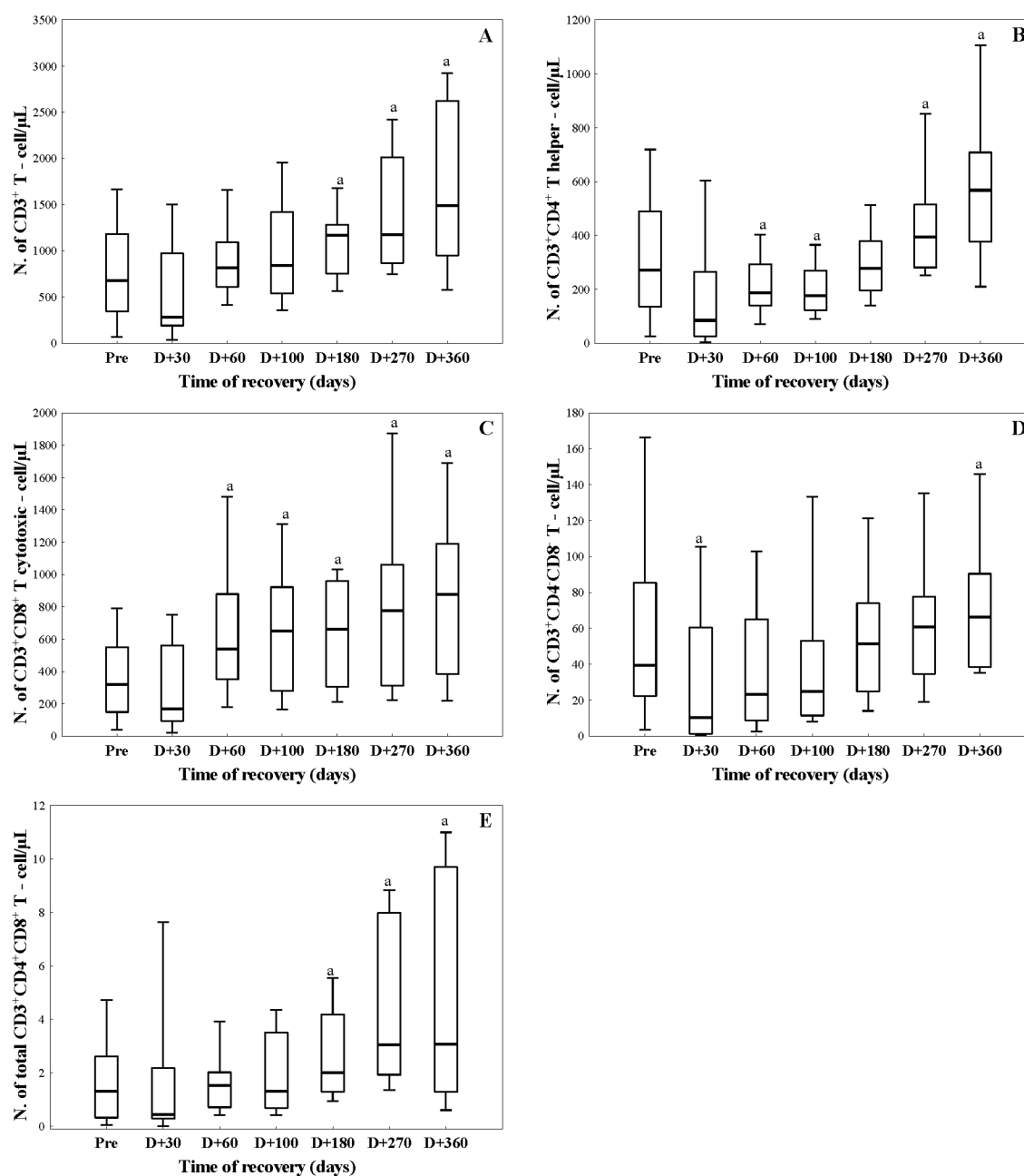
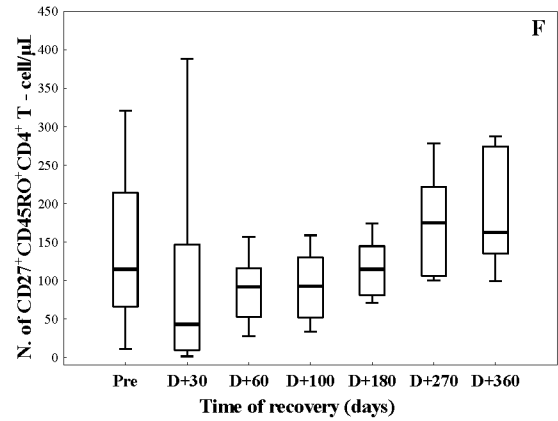
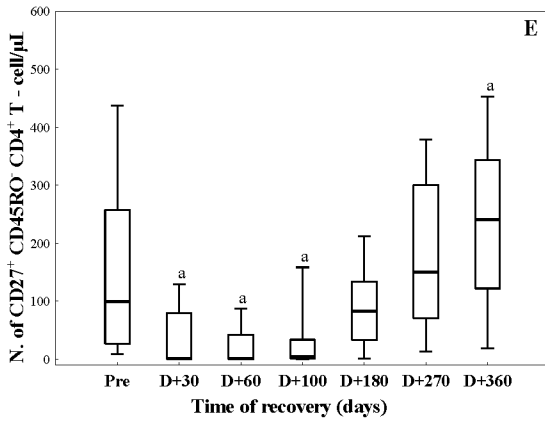
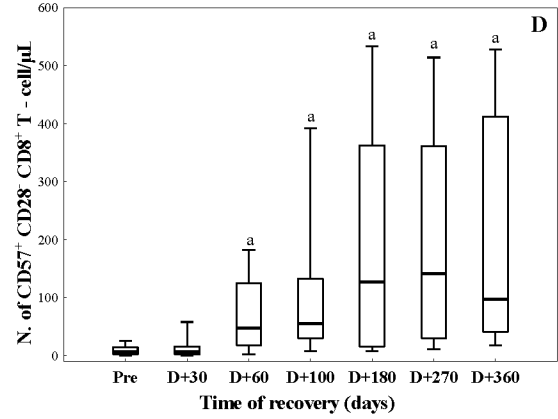
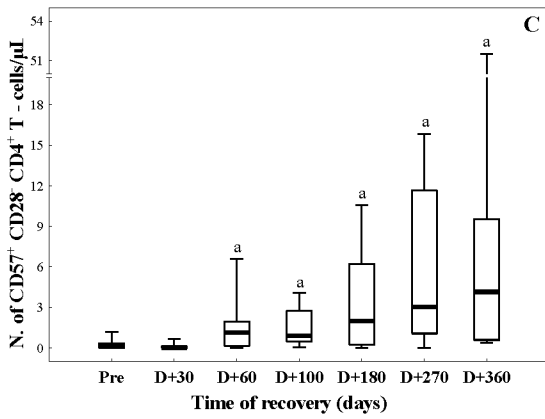
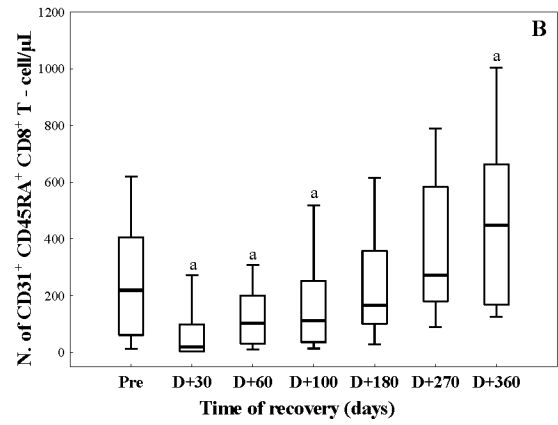
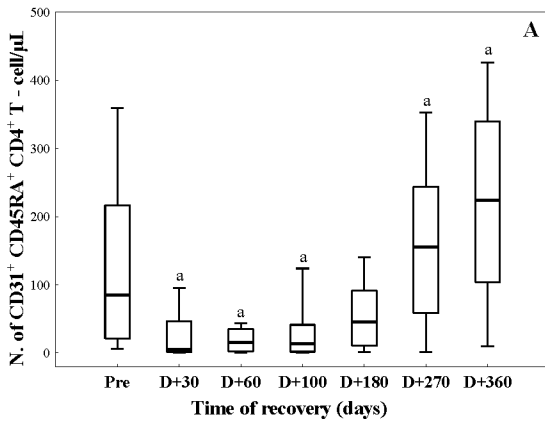
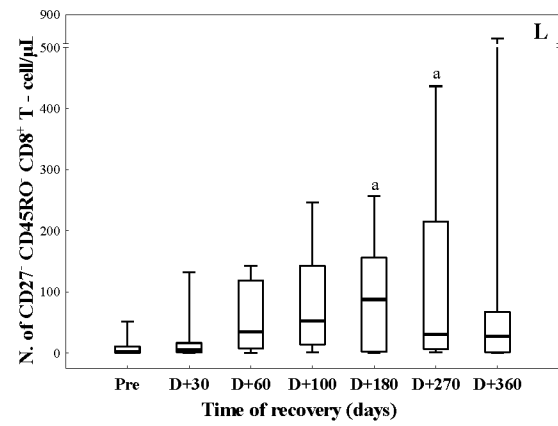
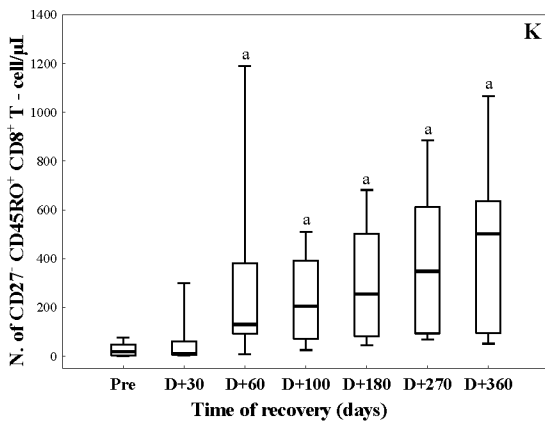
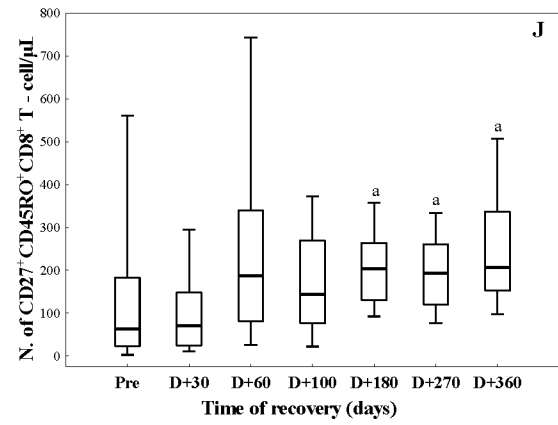
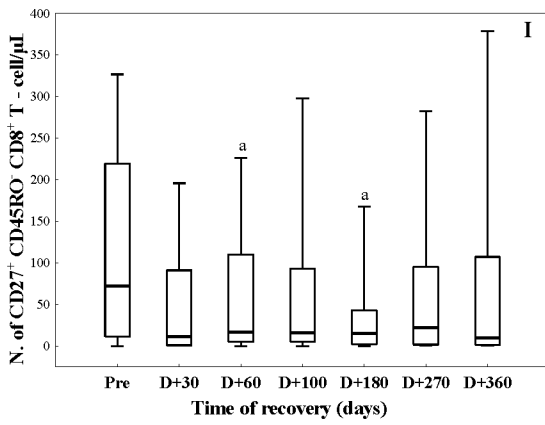
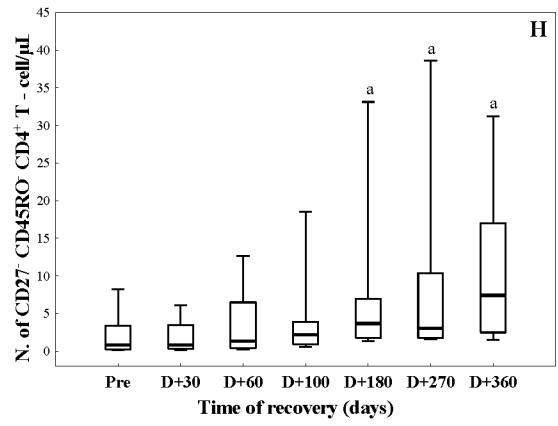
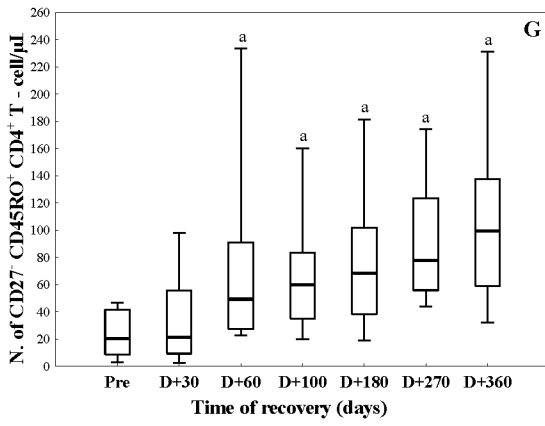


Figure 1. Kinetics of recovery of different subsets of PB lymphocyte following BMT. In each panel, results are expressed absolute as number of lymphocytes per/mL of PB at 7 different time points: prior to BMT (pre) and days +30 (D +30), D +60, D +100, D +180, D +270 and D +360. Different panels show the distribution at distinct cells subsets: **Panel A**, CD3+T-cells; **Panel B**, CD3+CD4+ helper T-cells; **Panel C**, CD3+CD8+ cytotoxic T-cells; **Panel D**, CD3+CD4-CD8- cytotoxic natural effector T-cells; **Panel E**, CD3+CD4+CD8+ cytotoxic T-cells. Notched-boxes represent the 25th and 75th percentile values; the line in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th per centile values, respectively. (a) $P < 0.05$.





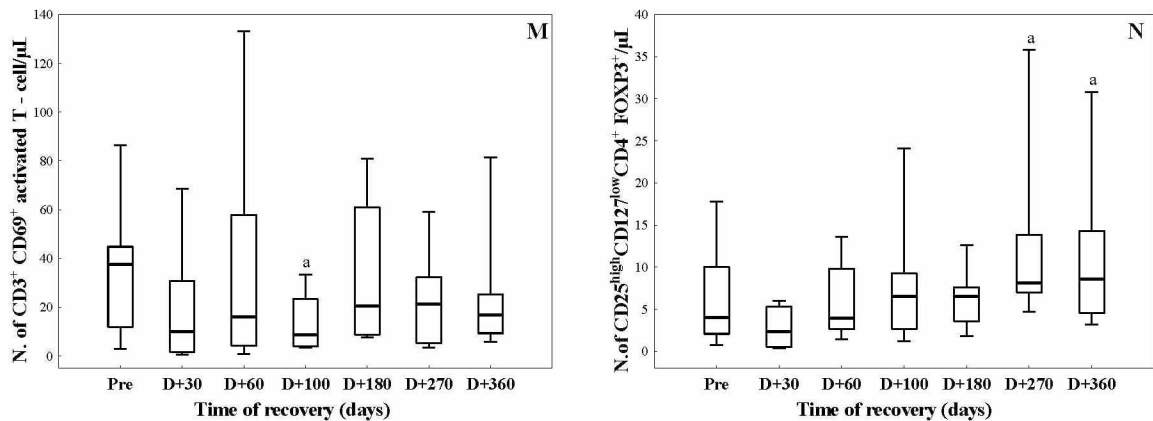


Figure 2. Kinetics of recovery of different subsets of PB T-cells after BMT. In each panel, results are expressed as absolute lymphocytes count per μL of PB prior to BMT (pre) and at days +30 (D +30), D +60, D +100, D +180, D +270 and D +360 after transplantation. In the different panels, the distribution of distinct subpopulations of T-cells is shown **Panels A and B:** $\text{CD31}^+\text{CD45RA}^+\text{CD4}^+$ or CD8^+ newly thymic emigrant T-helper cells (Panel A) and T-cytotoxic cells (Panel B), respectively; **Panels C and D:** $\text{CD57}^+\text{CD28}^-\text{CD4}^+$ or CD8^+ T senescent T-helper cells (Panel C) and T-cytotoxic cells (Panel D), respectively; **Panels E to H:** $\text{CD27}^+\text{CD45RO}^-$ naive (Panel E), $\text{CD27}^+\text{CD45RO}^+$ central memory (Panel F), $\text{CD27}^-\text{CD45RO}^+$ effector (Panel G) and $\text{CD27}^-\text{CD45RO}^-$ late effector (Panel H) CD4^+ T helper cells, respectively; **Panels I to L:** $\text{CD27}^+\text{CD45RO}^-$ naive (Panel E), $\text{CD27}^+\text{CD45RO}^+$ central memory (Panel F), $\text{CD27}^-\text{CD45RO}^+$ effector (Panel G) and $\text{CD27}^-\text{CD45RO}^-$ late effector (Panel H) CD8^+ cytotoxic T-cells, respectively; **Panels M and N:** $\text{CD3}^+\text{CD69}^+$ activated T cells (Panel M) and $\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low}}\text{FOXP3}^+\text{CD4}^+$ Tregs (Panel N), respectively. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and vertical lines correspond to median value and the 10th and 90th per centile values, respectively. (a) $P < 0.05$.

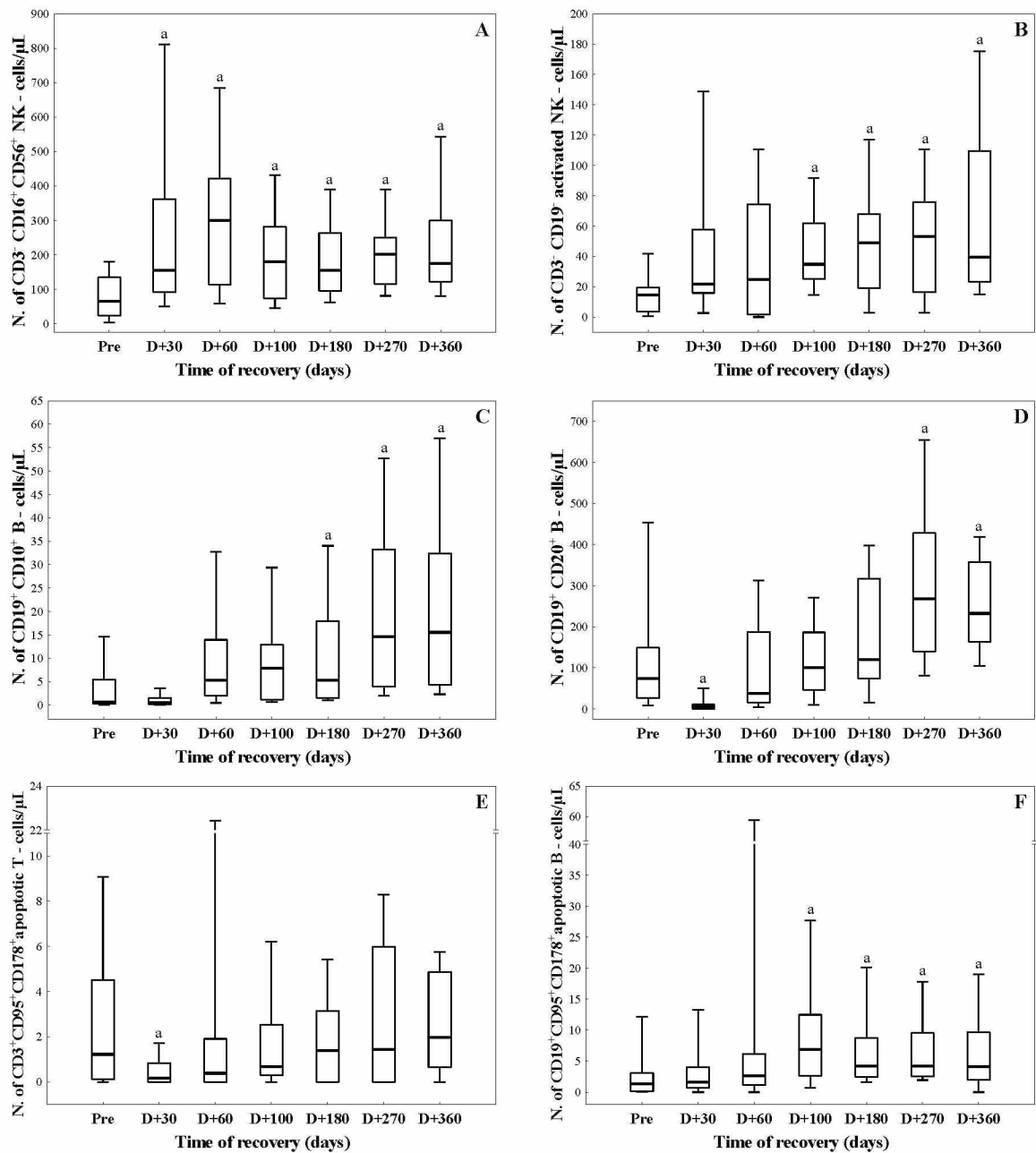


Figure 3. Kinetics of recovery of different subsets of PB NK-cells, B cells and apoptotic cells after BMT. In **Panels A and B** total $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ NK-cells and $\text{CD45}^{\text{high}}\text{SSC}^{\text{low}}\text{CD3}^+\text{CD19}^-\text{CD69}^+$ activated NK-cells are displayed; in turn, in **Panels C to F** the distribution of $\text{CD19}^+\text{CD10}^+$ immature B cells (Panel C), $\text{CD19}^+\text{CD20}^+$ total B cells (Panel D), $\text{CD3}^+\text{CD95}^+\text{CD178}^+$ apoptotic T-cells (Panel E) and $\text{CD19}^+\text{CD95}^+\text{CD178}^+$ apoptotic B cells (Panel F) are displayed, respectively. In each panel results are expressed as absolute cell number per μL of PB prior BMT (pre) and at days (D) +30, D +60, D +100, D +180, D +270 and D +360 after transplantation. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to median value and both the 10th and 90th per centile values, respectively. (a) $p < 0.05$.

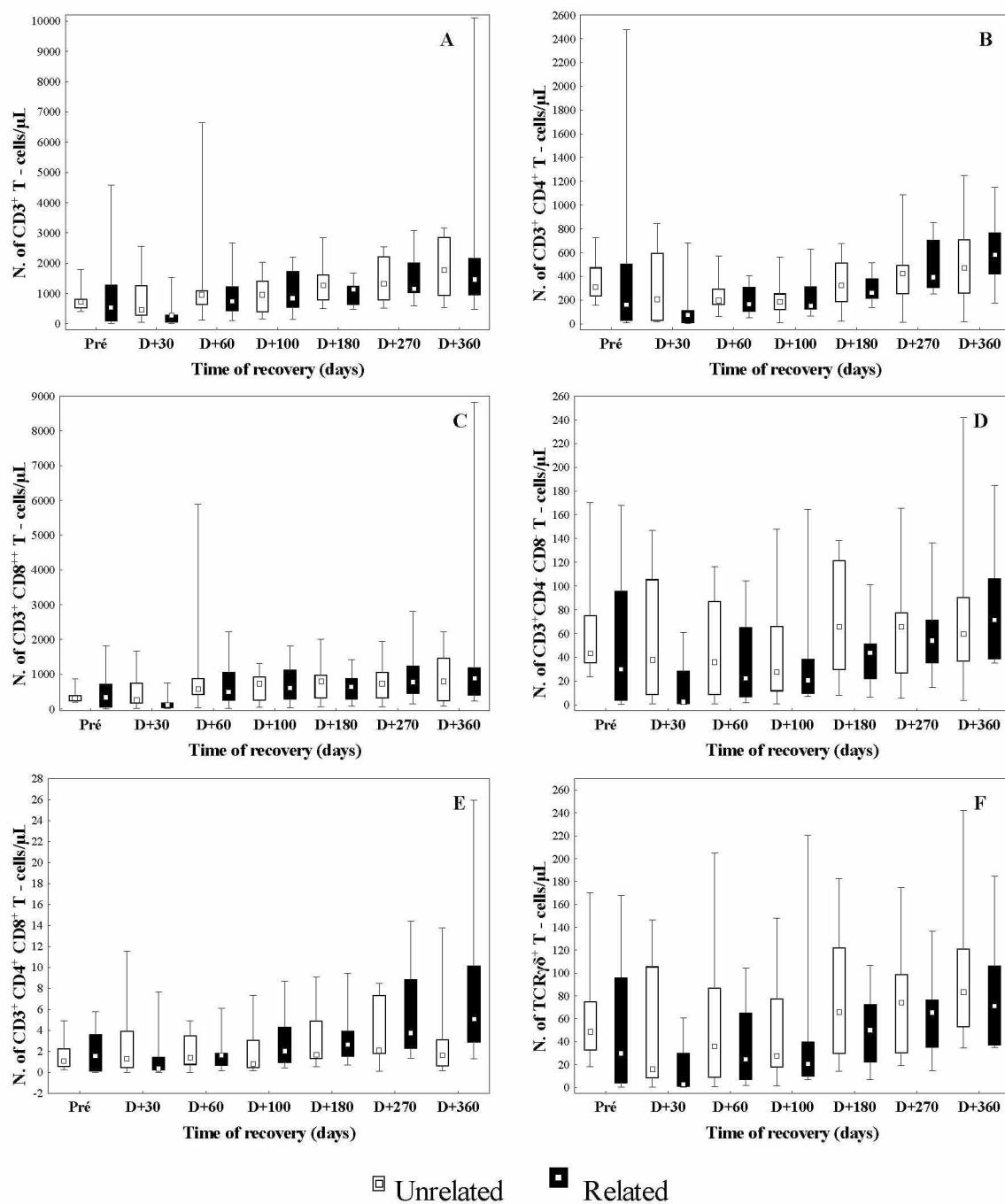


Figure 4. Comparison of immune reconstitution T lymphocyte subsets after unrelated and related bone marrow transplantation on days pre, 30 to 360 days after BMT. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to median value and both the 10th and 90th per centile values, respectively.

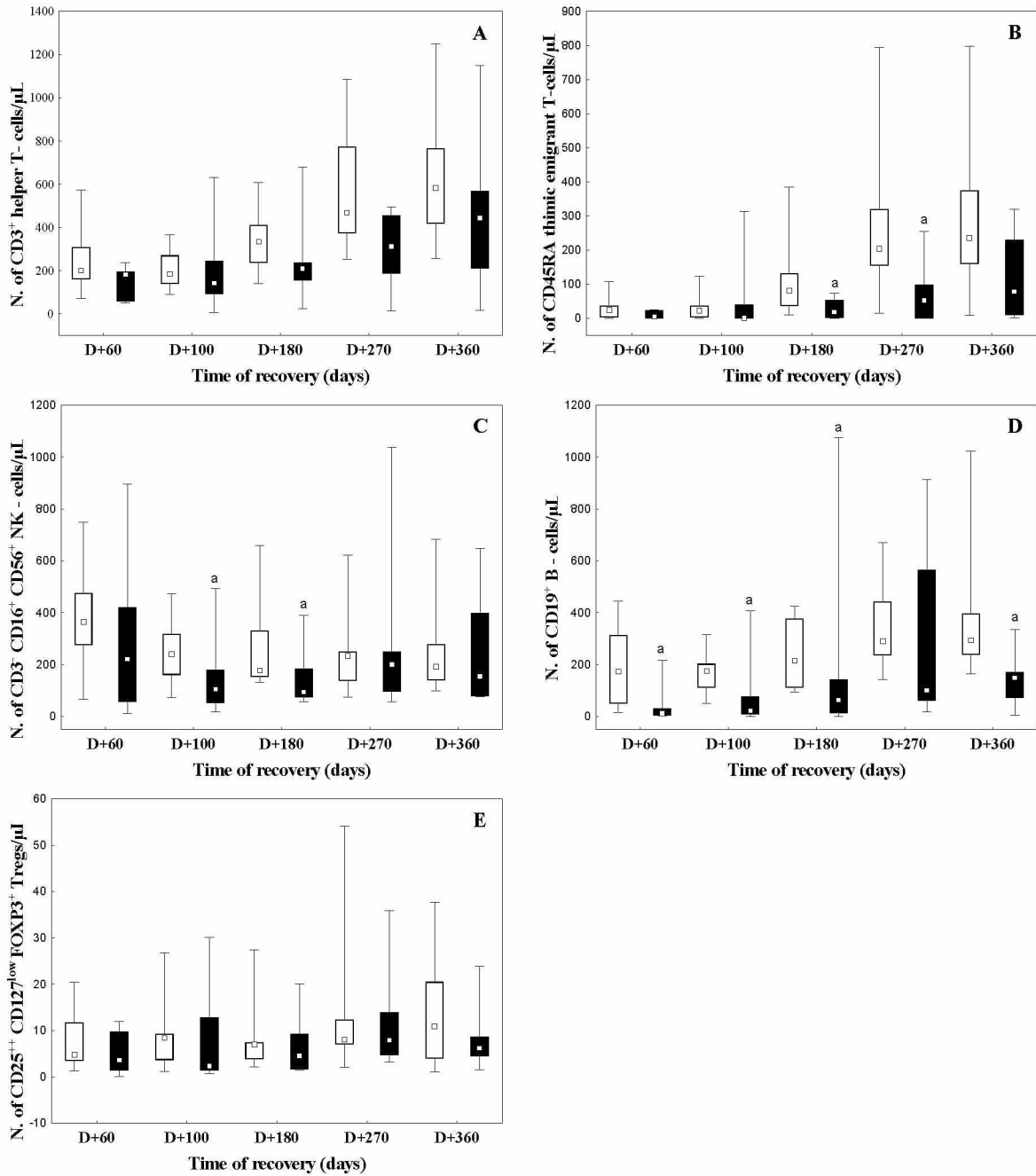


Figure 5. Recovery of different PB lymphocytes subsets showing significantly different kinetics after BMT in cases with (black boxes) vs without (white boxes) GVHD. Distribution of CD4⁺ helper T-cells (Panel A), CD45RA⁺CD31⁺ new thymic emigrant CD4⁺ T cells, (Panel B), CD3⁻ CD16⁺CD56⁺ N cells (Panel C), CD19⁺ B-cells (Panel D) and CD25^{high}CD127^{low} FOXP3⁺ Tregs is expressed as absolute cells number per µL of PB. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to median value and both the 10th and 90th percentile values, respectively.

ANEXO 2 – Consentimento livre e esclarecido

ANEXO 3 – Termo de assentimento

ANEXO 4 – Aceite da Comissão de Ética



2ª VIA

Curitiba, 07 de abril de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
Miriam Perlingeiro Beltrame
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**AVAIÇÃO DA RECONSTITUIÇÕES IMUNOLÓGICA EM TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CELULAS TRONCO-HEMATOPOÉTICAS, EM PACIENTES SUBMETIDOS A REGIME DE CONDICIONAMENTO MIELOABLATIVO**”, foi analisado com pendência pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27 de fevereiro de 2008. Após sanadas as pendências, o mesmo foi aprovado no dia 07 de abril de 2008. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0017.0.208.000-08
Registro CEP: 1599.016/2008-02

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 07 de outubro de 2008.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR