



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIE LILLIAN PIMENTEL JUSTUS

AVALIAÇÃO DO MONITORAMENTO DOS LINFÓCITOS T RECÉM-EMIGRADOS
DO TIMO (CD31⁺45RA⁺) APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS

CURITIBA

2023

JULIE LILLIAN PIMENTEL JUSTUS

AVALIAÇÃO DO MONITORAMENTO DOS LINFÓCITOS T RECÉM-EMIGRADOS
DO TIMO (CD31⁺45RA⁺) APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e Adolescente.

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Maria Sales Bonfim

Coorientadora: Dra. Miriam Perlingeiro Beltrame

Colaboradora: Dra. Ana Paula de Azambuja

CURITIBA

2023

Justus, Julie Lillian Pimentel
Avaliação do monitoramento dos linfócitos T recém-emigrados
do timo (cd31+45ra+) após transplante de células-tronco
hematopoéticas [recurso eletrônico] / Julie Lillian Pimentel Justus.
– Curitiba, 2023.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação
em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da
Saúde. Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Profa. Dra. Carmem M. S. Bonfim

1. Transplante de células-tronco hematopoéticas.
2. Linfócitos T. 3. Citometria de Fluxo. I. Bonfim, Carmem Maria
Sales. II. Beltrame, Miriam Perlingeiro. III. Programa de Pós-
Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de
Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE - 40001016013P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JULIE LILLIAN PIMENTEL JUSTUS intitulada: **Avaliação do monitoramento dos linfócitos T recém-emigrados do timo (CD31+45RA+) após Transplante de Células-tronco Hematopoéticas**, sob orientação da Profa. Dra. CARMEM MARIA SALES BONFIM, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 04 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

05/10/2023 23:38:19.0

CARMEM MARIA SALES BONFIM

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

16/10/2023 23:33:10.0

MATHEUS VESCOVI GONÇALVES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

04/10/2023 17:29:31.0

MIRIAM PERLINGEIRO BELTRAME

Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

06/10/2023 14:54:55.0

ANA PAULA DE AZAMBUJA

Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

21/10/2023 17:30:08.0

MARIA CLÁUDIA SANTOS SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Rua General Carneiro, 181 - 14º andar - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80060-900 - Tel: (41) 3360-7994 - E-mail: ppgsca@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 319853

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 319853

“Ao meu Pai Celestial pelo seu imenso amor, por permitir a realização desse trabalho.

Para minha família que é a razão da minha vida.

Para meus pais a quem eu quero honrar.

Para qualquer pessoa capaz de decidir por si mesmo, que não se limita as circunstâncias. Mas antes, percorre seus objetivos com humildade, gratidão e sabedoria.”

A estes, eu dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus e Pai. As minhas amigas e coorientadoras Dra. Miriam Perlingeiro Beltrame, por todo tempo em que convivemos, sendo mais que minha orientadora, coorientadora, ensinando além dos aspectos profissionais, me incentivando a crescer e amadurecer como pessoa e profissional e a Dra. Ana Paula de Azambuja, pela convivência próxima e duradoura e por me fazer vencer obstáculos e acreditar que sempre é possível.

A minha Orientadora Dra. Carmem Maria Sales Bonfim, por seu imenso conhecimento e pelo aceite e comprometimento com este trabalho.

A equipe da Citometria de fluxo do CHC -UFPR, que são mais que colegas, amigas, Noely, Yara, Edna, Mary e Denise, desta segunda casa que me acolhe desde 2004.

A equipe da Citometria de fluxo do Hospital Infantil Pequeno Príncipe, Dra. Fabíola, Julianne e Nayara.

Ao Alberto Cardoso Lima, por realizar as análises estatísticas.

A Dra. Gisele Loth, e Dra. Adriana Mello, pela confirmação e obtenção de alguns dados clínicos relacionados ao TCTH.

A minha amiga Denise Eli, por desbravar comigo esta jornada.

Ao amigo Eduardo Sbrana e Karyna Leal, pelo apoio e amizade.

Ao meu grupo familiar.

A minha família em especial meu filho Davi, que por muitas vezes trabalhou comigo neste propósito e aos meus amigos, que com um sorriso ou uma palavra de incentivo sempre estiveram comigo.

RESUMO

Introdução: O restabelecimento adequado da timopoiese é fundamental para a reconstituição imunológica a longo prazo após o transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCH) com possíveis impactos nas taxas de sobrevida. Este estudo tem como objetivo avaliar a reconstituição imunológica em pacientes pediátricos após o TCH através da quantificação dos linfócitos T recém-emigrados do timo (RET), especificamente CD3⁺CD31⁺CD45RA⁺. **Métodos:** Estudo retrospectivo de 186 pacientes pediátricos transplantados entre 2013 e 2020 e com análises em três momentos: D+100, D+180 e D+360. Para avaliar a recuperação imunológica, analisamos os subconjuntos de linfócitos T, B e natural killer (NK) em amostras de sangue periférico, nos quais observamos o efeito da doença de base, tipo de TCH, origem das células tronco-hematopoiéticas, idade do receptor, tipo de condicionamento, ocorrência de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e da reativação do citomegalovírus (CMV). **Resultados:** No D+100 o grupo com idade inferior a 10 anos apresentou contagens mais elevadas de RET CD4⁺ e RET CD8⁺ quando comparado com o grupo com idade superior a 10 anos (5,3/μL vs 2,2/μL, $p=0,022$), e (48/μL vs 72,8/μL, $p=0,049$), respectivamente. Os pacientes que receberam TCH haploidêntico apresentaram uma menor população CD4⁺ RET quando comparados ao grupo que recebeu TCH de doador não aparentado e o grupo que recebeu de doador aparentado (2,4/μL, vs 4,4/μL vs 7,9/μL, $p=0,024$), respectivamente. A administração de *rabbit* globulina anti-timocítica (ATG) teve um impacto negativo na mediana da produção de RET CD4⁺ (6,5/μL vs 2,4/μL, $p=0,007$). No D+180 a presença doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa) influenciaram negativamente na produção de RET (11,7/μL, vs 56,8/μL $p<0,001$) em relação aos pacientes sem DECH. O grupo de pacientes com reativação do CMV mostraram o RET CD8⁺ mais elevado (mediana 204,6/μL vs 100,2/μL, $p=0,022$) quando comparado ao grupo sem reativação. No D+360 nenhuma variável foi significativa em relação à recuperação do RET. A sobrevida global foi de 87,7% em 5 anos de seguimento, mediana de 1170 dias (122 a 3316 dias). A idade superior a 10 anos ($p=0,038$), a sorologia negativa do doador para CMV ($p=0,0029$) e a DECHa ($p=0,0026$) evidenciaram um impacto negativo na sobrevida como demonstrado na análise multivariada. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que a produção dos linfócitos T recém-emigrados do timo após TCH para doenças malignas e não malignas pode diferir com a idade do paciente, tipo de doador e imunossupressão utilizada.

PALAVRAS-CHAVE: Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas, Recuperação Imune, Linfócitos T recém-emigrados do timo, Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

Introduction: Adequate reestablishment of thymopoiesis is critical for long-term immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation (HCT), potentially impacting patient survival rates. This study aims to assess immune reconstitution in pediatric HCT recipients by quantifying recent thymic emigrants (RTE), specifically CD3⁺CD31⁺CD45RA⁺ cells. **Methods:** Retrospective analysis of 186 pediatric patients transplanted between 2013 and 2020, with analysis at three time points: D+100, D+180 and D+360. To assess immune recovery, we analyzed the subsets of T, B and *natural killer* (NK) lymphocytes in peripheral blood samples, in which we observed the effect of underlying disease, type of HCT, source of stem cells, age of recipient, type of conditioning, occurrence of graft-versus-host disease (GvHD) and reactivation of cytomegalovirus (CMV). **Results:** At D+100 the group aged under 10 years had higher counts of RTE CD4⁺ and RTE CD8⁺ when compared to the group aged over 10 years (5.3/ μ L vs 2.2/ μ L, $p=0.022$), and (48/ μ L vs 72.8/ μ L, $p=0.049$), respectively. Patients who received haploidentical HCT had a lower RTE CD4⁺ population compared when compared to the unrelated donor and the related donor group (2.4/ μ L, vs 4.4/ μ L vs 7.9/ μ L, $p=0.024$), respectively. The administration of *rabbit* anti-thymocyte globulin (ATG) had a negatively impacted on median RTE CD4⁺ production (6.5/ μ L vs 2.4/ μ L, $p=0.007$). At D+180 the presence of acute graft-versus-host disease (aGvHD) had a negative impact RTE production (11.7/ μ L, vs 56.8/ μ L $p<0.001$) compared to patients without GvHD. The group of patients with CMV reactivation showed higher RTE CD8⁺ (median 204.6/ μ L vs 100.2/ μ L, $p=0.022$) when compared to the group without reactivation. At D+360 no variable was significant in relation RTE recovery. Overall survival was 87.7% at 5-year follow-up, median 1170 days (122 to 3316 days). Age >10y ($p=0.038$), negative donor serology for CMV ($p=0.0029$), and aGvHD ($p=0.0026$) negatively impact survival in multivariate analysis. **Conclusion:** This study showed that the production of the recent emigrated T lymphocytes after HCT for malignant and non-malignant diseases can differ according to patient age, donor type and immunosuppression used.

Keywords: Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Immunological Recovery, Lymphocytes T recent thymic emigrant (RTE), Flow Cytometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO:

FIGURA 1	–	POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRAS ANALISADAS APÓS O TCTH - D+100, D+180 E D+360	31
FIGURA 2	–	ANÁLISE DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS	33

ARTIGO CIENTÍFICO:

FIGURE 1	–	GATING STRATEGY FOR THE ANALYSIS OF CELL SUBSETS.....	57
FIGURE 2	–	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , T RTE CD4 AND CD8 LYMPHOCYTES ABSOLUTE VALUES (CELLS/ μ L) COMPARED BETWEEN GROUPS YOUNGER AND OLDER THAN 10 YEARS, RTE CD4 ⁺ CD31 ⁺ CD45RA ⁺ ABSOLUTE VALUES (CELLS/ μ L) COMPARED BETWEEN DONOR TYPES, AND COMPARED BETWEEN NON-USE OF r-ATG, D+100.....	58
FIGURE 3	–	OVERALL SURVIVAL IN RELATION TO CD4 ⁺ T LYMPHOCYTES THRESHOLDS AND RTE CD4 ⁺ AT D+100.....	59

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO:

TABELA 1	–	ANTICORPOS MONOCLONAIS E FLUOROCROMOS UTILIZADOS NO CITÔMETRO BDFACSCalibur™ e BDFACSCanto™ II	35
----------	---	--	----

ARTIGO CIENTÍFICO:

TABLE 1	–	PATIENT'S DEMOGRAPHICS.....	51
TABLE 2	–	LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS.....	53
TABLE S1	–	LEUKOCYTES, LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS, D+100, D+180, D+360.....	54
TABLE S2	–	MEDIAN VALUES FOR RTE CD4 ⁺ CD31 ⁺ CD45RA ⁺ , D+100, D+180, D+360.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	–	Anemia Aplástica Severa
AcMo	–	Anticorpo monoclonal
AF	–	Anemia de Fanconi
APC	–	do inglês “allophycocyanin”
r-ATG	–	do inglês “rabbit anti-thymocyte-globulin”
CD	–	do inglês “Cluster Differentiation”
CFA	–	Ciclofosfamida
CFM	–	Citometria de Fluxo Multiparamétrica
CHC	–	Complexo Hospital de Clínicas
CMV	–	Citomegalovírus
CSA	–	Ciclosporina
CTH	–	Célula-tronco hematopoiética
DECH	–	Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
DNA	–	Deoxyribonucleic Acid” ou Ácido desoxirribonucleico
FACS	–	do inglês “Fluorescence-Activated Cell Sorter”
FITC	–	do inglês “Fluorescein Isothiocyanate” ou Isotiocianato de fluoresceína
FSC	–	do inglês “Forward Scatter” ou dispersão frontal
G-CSF	–	do inglês “Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos”
HLA	–	do inglês “Human Leukocyte Antigen”
ICT	–	Irradiação corporal total
MAC	–	do inglês “Myeloablative Conditioning”
MMF	–	Micofenolato de mofetila
MTX	–	Metotrexato
PCR	–	do inglês “Polymerase Chain Reaction”
PE	–	do inglês “Phycoerythrin”
PERCP	–	do inglês “Peridinin-chlorophyll Protein Complex”
PTI	–	Púrpura Trombocitopênica idiopática
RET	–	Recém-Emigrado do Timo
RI	–	Reconstituição Imunológica
RIC	–	do inglês “Reduced Intensity Conditioning”

RNA	–	Ácido Ribonucleico
SCID	–	do inglês “Severe Combined Immunodeficiency”
SSC	–	do inglês “Side Scatter”
TCR	–	do inglês “T cell receptor”
TCTH	–	Transplante de Célula-Tronco hematopoiética
TREC	–	do inglês “T Cell Receptor excision circle”
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
UOH	–	Unidade de Oncologia Hematologia e Transplante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA	15
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo principal	15
1.2.2 Objetivos secundários	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH): DEFINIÇÃO E MODALIDADES DE TRATAMENTO PARA DOENÇAS HEMATOLÓGICAS	16
2.2 HEMATOPOESE E PEGA DO ENXERTO	17
2.3 IMUNIDADE INATA, ADQUIRIDA E RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA (RI) APÓS TCTH)	18
2.4 TIMOPOESE	21
2.5 COMPATIBILIDADE HLA (ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO)	22
2.6 CONDICIONAMENTO E IMUNOSSUPRESSÃO	23
2.7 DECH AGUDA	25
2.8 DECH CRÔNICA	26
2.9 CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA (CFM)	277
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 TIPO DE ESTUDO	29
3.2 HIPÓTESE	29
3.3 LOCAL E PERÍODO	29
3.4 POPULAÇÃO FONTE	30
3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	30
3.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	30
3.7 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA	30
3.8 VARIÁVEIS DE ESTUDO E DESFECHOS.....	31
3.9 CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA UTILIZADA.....	32
3.10 MÉTODOS E PROCEDIMENTOS DE ESTUDO	36
3.11 TABULAÇÃO E GERENCIAMENTO DE DADOS	36
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

3.13 ÉTICA EM PESQUISA	37
3.14 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA	37
3.15 FOMENTO PARA PESQUISA, PROFISSIONAL E INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE	37
4 ARTIGO CIENTÍFICO	39
5 CONCLUSÕES	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE 1 – ESTADIAMENTO E GRADUAÇÃO DA DECH AGUDA POR ORGÃO	67
ANEXOS	68
ANEXO 1 – PARECER SUBSTANCIADO DO CEP	68
ANEXO 2 – RESUMO SUBMETIDO AO CONGRESSO SBTMO 2022	71
ANEXO 3 – RESUMO SUBMETIDO AO CONGRESSO SBTMO 2023	73

1 INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é um procedimento com potencial curativo, utilizado como tratamento para várias condições malignas e não malignas, hematológicas e não hematológicas (GYURKOCZA; REZVANI; STORB, 2010, VELARDI *et al.*, 2021). Embora a eficácia e a segurança tenham aumentado nas últimas décadas, alguns efeitos indesejados pós TCTH; como toxicidade aguda grave, reativação viral, doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), aguda e/ou crônica ou recaídas em caso das doenças malignas, recuperação imune tardia, são desafios relacionados a sobrevivência do paciente (BOELEN; HOSSZU; NIERKENS, 2020).

O TCTH consiste na substituição de uma medula óssea doente ou deficitária por células normais de um doador, com o objetivo de restabelecer a hematopoese (ARMITAGE, 1994). A regeneração total da hematopoese, iniciada pelo repovoamento das células do enxerto na medula óssea, através do desenvolvimento, maturação e diferenciação das diversas linhagens celulares sanguíneas e imunológicas, um dos primeiros indicadores do enxerto é a recuperação neutrofilica e plaquetária (LIGEIRO, 2016).

O processo de recuperação hematológica (pega do enxerto) e da reconstituição imunológica (RI), dependerá de diversos fatores como: idade do receptor, diagnóstico inicial, complexo principal de histocompatibilidade, regime de condicionamento, uso de depleção das células T, imunoprofilaxia contra DECH e da presença de infecções pré e pós transplante (REIS; VISENTAINER, 2004; LACERDA, 2004; ADMIRAAL *et al.*, 2016). A RI é monitorada através do exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM), das subpopulações linfocitárias. (FEDELE, 2012; FALLEN *et al.*, 2012; CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019).

O monitoramento ganhou destaque através de análises mais detalhadas de subconjuntos de linfócitos T, além dos linfócitos B e NK. (DEKKER, *et al.*, 2020). A pesquisa dessas populações linfocitárias é avaliada pelo uso de anticorpos monoclonais como; linfócitos T CD3⁺, linfócitos T *helper* ou auxiliares (CD3⁺CD4⁺), linfócitos T citotóxicos ou citolíticos (CD3⁺CD8⁺), linfócitos B CD19⁺ e linfócitos NK CD16⁺ e/ou CD56⁺ (ABBAS; LICHTMAN, 2005, HOLMBERG-THYDEN *et al.*, 2021).

No compartimento de linfócitos T, as células T *naive* (Tn) ou virgens, são fenotipicamente heterogêneas, capazes de se proliferarem e diferenciarem (DEKKER *et al.*, 2022). Nesse “*pool*” de Tn se encontram os linfócitos T recém-emigrados do timo (RET), com fenótipo CD31⁺CD45RA⁺, podendo ser quantificados por CFM, em células T CD4⁺ e T CD8⁺ (BELTRAME, 2013; BATOROV *et al.*, 2017; DEKKER *et al.*, 2020).

A partir de 2000, alguns trabalhos mostraram a importância da identificação dos linfócitos T RET (JUNGE *et al.*, 2007; KOLHER; THIEL, 2008; GREINIX *et al.*, 2014; GABALLA, *et al.*, 2016; GLOWALA-KOSINSKA; *et al.*, 2016; BATAROV; *et al.*, 2017). Estes estudos demonstraram que a expressão do CD31⁺ nos linfócitos T CD4 representa um marcador celular da reativação da função tímica, que pode ser usado para monitorar atividade tímica, mesmo depois de terapia ablativa, como marcador da competência imune.

No Complexo Hospital de Clínicas CHC-UFPR, a partir de 2010, foram inseridos no painel de linfócitos na rotina pós transplante, marcadores para avaliar os linfócitos T (RET). Nos pacientes transplantados por Anemia de Fanconi, a RI dos linfócitos T RET CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺ e CD8⁺CD31⁺CD45RA⁺ tiveram os níveis basais aumentados apenas seis meses após o TCTH, o que sugere que estes linfócitos T não são expansões das células presentes no enxerto transplantado, e sim, novos linfócitos T produzidos pelo hospedeiro (BELTRAME, 2013).

Diante do exposto e da necessidade de avaliar a RI nos diferentes tipos de doenças, o objetivo do presente estudo foi verificar a dinâmica dos linfócitos T RET, pós TCTH, em doenças hematológicas malignas e não malignas, no período de 2013 a 2020, de dois Centros Transplantadores, bem como avaliar associação entre os valores de linfócitos T, B e NK e dos linfócitos RET e as possíveis complicações clínicas dessa terapia.

1.1 JUSTIFICATIVA

Desde 1998 o Laboratório de Citometria do CHC realiza os exames de quantificação das subpopulações linfocitárias. Esta experiência permitiu um maior conhecimento e motivação para os estudos posteriores na área da recuperação imunológica (RI). No ano de 2014, o estudo em pacientes com Anemia de Fanconi, utilizou um amplo painel de anticorpos monoclonais, inclusive marcadores para avaliar os linfócitos RETs, que permitiu um melhor entendimento da RI nesse grupo de pacientes. A partir desse estudo houve a necessidade de avaliar os linfócitos T RET em outras doenças hematológicas malignas e não malignas, além de outras características envolvidas no TCTH. Outro fator importante que justifica o estudo foi a evolução tecnológica do laboratório de citometria de fluxo, que passou a utilizar o citômetro de fluxo de oito cores a partir de 2017, que proporcionou a análise simultânea de vários marcadores, otimizando o estudo e melhor especificidade para a avaliação da célula-alvo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo principal

Quantificar as subpopulações linfocitárias T RET (recém-emigrado do timo), de fenótipo $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ e $CD8^+CD45RA^+CD31^+$ nas amostras de sangue periférico dos pacientes submetidos ao TCTH nos dias D+100, D+180 e D+360.

1.2.2 Objetivos secundários

- a) Quantificar as subpopulações linfocitárias de linfócitos T $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, linfócitos B $CD19^+$ e linfócitos NK $CD16^+e/ouCD56^+$.
- b) Avaliar se os linfócitos T $CD4^+$ e RET $CD4^+$ estavam relacionados à reativação por CMV, DECH aguda e sobrevida global.
- c) Avaliar se os biomarcadores $CD31^+$ e $CD45RA^+$ contribuíram na avaliação da RI nos grupos das doenças hematológicas malignas e não malignas, maiores

e menores de 10 anos e nos tipos de transplante (aparentado, não aparentado e haploidêntico).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH): DEFINIÇÃO E MODALIDADES DE TRATAMENTO PARA DOENÇAS HEMATOLÓGICAS

O TCTH é definido pela substituição da medula óssea doente ou deficitária por células normais da medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical, com o objetivo de restabelecer a hematopoese; considerado há algumas décadas uma opção terapêutica potencialmente curativa para doenças hematológicas malignas e não malignas (ARMITAGE, 1994; GYURKOCZA; REZVANI; STORB, 2010; VELARDI *et al.*, 2021). O TCTH é indicado para uma variedade de doenças malignas e não malignas como: Leucemia aguda, Anemia Aplástica Severa (AAS), Imunodeficiência Combinada Severa (*Severe Combined Immunodeficiency - SCID*), porém as indicações se ampliaram para outras doenças: Linfomas, Mieloma Múltiplo, Síndromes Mielodisplásicas e outras formas de distúrbios metabólicos, hematológicos e imunológicos hereditários (KOLINS *et al.*, 2011; GABALLA *et al.*, 2016, DEKKER *et al.*, 2022). As doenças hematológicas se caracterizam por alguma falha na hematopoese, que é o processo de formação, maturação e desenvolvimento das diferentes linhagens celulares do sangue, com origem em uma célula pluripotente ou células-tronco hematopoiéticas (CTHs) (LIGEIRO, 2016). Entre as neoplasias hematológicas é a melhor opção de tratamento para pacientes com leucemia de alto risco ao diagnóstico, recidivadas e refratárias a quimioterapia (MORANDO *et al.*, 2010; DEKKER *et al.*, 2020). As modalidades de TCTH são classificadas de acordo com o tipo de doador em: autólogo ou autogênico, quando as células são originárias do próprio paciente; singênico, quando o doador é um irmão gêmeo univitelino; alogênico, quando o doador é geneticamente diferente do receptor, podendo ser familiar (aparentado) ou não familiar (não aparentado), o critério de seleção é estabelecido entre a melhor compatibilidade, doador e receptor (PASQUINI; COUTINHO, 2004; SOARES, *et al.*, 2007).

2.2 HEMATOPOESE E PEGA DO ENXERTO

A Hematopoese é um processo complexo que ocorre em um microambiente “nichos” compostos de componentes celulares (osteoblastos, adipócitos, células endoteliais vasculares, células-tronco mesenquimais, células reticulares, células neurais) e acelulares (tensão de oxigênio, concentração de cálcio, cisalhamento e suporte mecânico) de maneira dinâmica e tem influência na diferenciação e proliferação das CTHs (WANG, L. D, WAGERS, A. J, 2014).

A medula óssea é um tecido derivado do mesênquima que contém um tecido conjuntivo de sustentação e nutrição do ambiente denominado estroma, onde se localizam as CTHs ou *stem cell*. É nesse ambiente que as CTHs se proliferam formando as diferentes linhagens celulares. Em adultos a produção das células sanguíneas é feita em ossos achatados e esponjosos como o esterno, ossos da bacia ou crista ílfaca, porções proximais dos úmeros e fêmures (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 1996). Após o TCTH é necessária uma avaliação da regeneração total da hematopoiese, iniciando pelo repovoamento das células do enxerto na medula óssea, desenvolvimento, maturação e diferenciação efetora das diversas linhagens celulares sanguíneas e imunológicas (LIGEIRO, 2016).

A evolução da granulopose (formação e maturação dos neutrófilos) é considerada um indicador funcional do enxerto e da regeneração hematopoiética. A contagem celular absoluta de neutrófilos em sangue periférico superior a $500/\text{mm}^3$, por três dias consecutivos, ou uma única contagem superior a $1500/\text{mm}^3$, indica regeneração medular ou “pega” neutrofilica. A “pega” plaquetária é definida pela contagem de plaquetas acima de $20.000/\text{uL}$, sem suporte transfusional por 7 dias antecedentes a contagem (BOFFO, 2014; LIGEIRO, 2016). Outros leucócitos da imunidade inata, como linfócitos NK e monócitos, também podem ser vistos no hemograma entre as primeiras semanas após o TCTH; e a recuperação da imunidade celular e humoral dependendo do tipo de TCTH (autólogo ou alogênico) pode levar em torno de seis meses ou anos (REIS; VISENTAINER, 2004; GEDDES; STOREK, 2007).

2.3 IMUNIDADE INATA, ADQUIRIDA E RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA (RI) APÓS TCTH)

A condição deficiente do sistema imunológico do paciente pós TCTH, torna-o mais passível a infecções oportunistas, que aumentam a mortalidade. A recuperação do sistema imunológico funcional, ocorre de forma gradativa, se inicia pela recuperação dos leucócitos da imunidade *inata*, seguida da recuperação da imunidade adaptativa (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A imunidade *Inata* é considerada a primeira defesa do sistema imunológico. As células que primeiro atuam contra micro-organismos são os granulócitos com função efetora no mecanismo de infecção e inflamação. Enquanto nos tecidos essa função se divide entre os macrófagos, mastócitos e células dendríticas, que fazem apresentação e digestão de antígenos. Estes constituintes celulares são responsáveis pela ativação e direcionamento da imunidade adaptativa, que ocorre por das células linfoides, que circulam pelo sangue periférico e por tecidos linfoides periféricos (linfonodos). Os linfócitos têm a capacidade genética de portar receptores antígenos específicos, de maneira que, entre milhões de linfócitos cada um terá receptores de antígenos de especificidades únicas, diferentes entre si, o que confere diversidade estrutural e funcional, ou seja, um vasto repertório de receptores linfocitários (JANEWAY JR *et al.*, 2007).

Os neutrófilos, eosinófilos e basófilos maduros presentes em sangue periférico são leucócitos resultantes da unidade de formação de colônias CFU-G, suas funções são diversificadas e geralmente estão associadas, respectivamente a: processos inflamatórios bacterianos, produção de citocinas a respostas parasitárias, processos de liberação e histaminas relacionados a reações alérgicas, todos constituem parte da imunidade *inata*. Os monócitos se originam da Unidade Formadora de Colônia – Granulócito-Monócítico (CFU-GM), fazem parte do sistema imunológico inato, tem características efetoras, com receptores de quimiocinas e moléculas de adesão. Podem migrar do sangue periférico para tecidos em processos inflamatórios. Quando ativados podem se diferenciar em macrófagos e/ou células dendríticas, se caracterizando em células da imunidade adaptativa (LIGEIRO, 2016).

Os linfócitos B são células da imunidade adaptativa, produzidas na medula óssea. A membrana celular contém o receptor de antígeno da célula B (BCR), que é uma forma de anticorpo ou imunoglobulinas. Os linfócitos T são produzidos no timo,

onde também ocorre a diferenciação e a seleção, quando expressam na membrana o receptor de antígeno da célula T (TCR). Tanto linfócitos T quanto B, após o processo de maturação celular migram para os órgãos linfoides periféricos ou secundários; linfonodos, baço e outros tecidos associados a mucosas fazendo, portanto, parte da imunidade adaptativa uma vez que essa se inicia em órgãos periféricos. Os linfócitos NK, apesar ter o mesmo progenitor comum dos linfócitos B e T, não possuem em sua membrana receptores antígeno-específicos, o que as caracteriza como células da imunidade inata, capazes de matar algumas células infectadas por vírus ou células tumorais (JANEWAY JR *et al.*, 2007).

A reconstituição imunológica funcional pode ser alterada por fatores pré e pós transplante: a idade do paciente e consequente involução tímica, a compatibilidade HLA, regime de condicionamento e imunossupressão e depleção de células T, estão relacionados (LACERDA, 2004), a dose de CTHs enxertadas (BOELEN; HOSSZU; NIERKENS, 2020), a utilização de sangue periférico como fonte celular mobilizadas com fator estimulante de granulócitos, pode favorecer a RI de linfócitos T, em relação a enxertos com medula óssea (WALLER *et al.*, 2019).

A avaliação da reconstituição imunológica leucocitária quantifica de forma percentual e absoluta as populações de: neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. No entanto, a avaliação da reconstituição imunológica linfocitária é realizada através do exame de imunofenotipagem por CFM, no qual são utilizados anticorpos monoclonais para avaliar as subpopulações linfocitárias T, B e NK (*natural killer*) (PEGGS; MACKINNON, 2004; AULETTA; LAZARUS, 2005). Os linfócitos T comumente analisados são: linfócitos T CD3⁺, que possuem uma proteína de membrana associada ao receptor de célula T (TCR) denominada CD3, a qual é responsável pela transdução de sinal dos receptores antigênicos. Os linfócitos T *helper* auxiliares expressam uma proteína de membrana denominada de CD4, (CD3⁺CD4⁺), os linfócitos T citotóxicos ou citolíticos expressam uma proteína de membrana conhecida como CD8 (CD3⁺CD8⁺); esses tipos células T diferem-se em relação a classe de moléculas MHC, sendo MHC classe II para células CD4 e MHC classe I para CD8. Os linfócitos B CD19⁺, que são capazes de produzir imunoglobulinas ou anticorpos, contra antígenos reconhecidos pelo receptor de célula B (BCR) e linfócitos NK CD16⁺CD56⁺, tem atividade efetora que necessita manter o equilíbrio, entre ativação e inibição, nos processos que combatem infecção e tumores (ABBAS; LICHTMAN, 2005; LIGEIRO, 2016).

A cinética da reconstituição imunológica das células linfoides ocorre de maneira distinta, segundo Berger *et al.*, (2008), as células que primeiro reconstituíram foram os linfócitos NK, linfócitos T CD8⁺, enquanto os linfócitos T CD4⁺ por até dois anos após o TCTH. A RI também foi descrita por Lacerda *et al.*, (2004), em que as células da imunidade celular (neutrófilos e linfócitos NK) se recuperam rapidamente em relação a células da imunidade humoral. A recuperação precoce dos linfócitos T CD4⁺ está relacionada com melhor sobrevida global e menor mortalidade relacionada à doença e mortalidade relacionada ao transplante (FEDELE, 2012).

No repertório de linfócitos T, a subpopulação de linfócitos T *naive* (Tn), expressam a molécula CD45RA, de 200 kDa, que é uma isoforma do CD45 (antígeno *pan-leucocitário*), porém com um segmento codificado por um *exon* designado como A, enquanto os linfócitos T de memória expressam a isoforma CD45RO, de 180 kDa (ABBAS; LICHTMAN, 2005; JUNGE, *et al.*, 2007). A molécula CD31 (PECAM-1), é uma molécula de adesão celular da superfamília das imunoglobulinas, presentes em leucócitos ativados e nas junções intercelulares das células endoteliais, descrita como uma glicoproteína transmembrana de 130-kDa, estão presentes nas células Tn. Essas células possuem uma grande quantidade de TRECs (*T cell receptor excision circles*), um rearranjo gênico do receptor da célula T estável dentro dos linfócitos, que não se replicam e são diluídos com a divisão celular, portanto são ótimos marcadores de células T virgens recém-emigradas do timo (RET). A técnica capaz de identificar e quantificar as TRECs é a PCR (Reação de cadeia de polimerase) através da purificação e isolamento do DNA (ácido desoxirribonucleico) (JANEWAY JR *et al.*, 2007; GLOWALA-KOSINSKA *et al.*, 2016).

O monitoramento dos linfócitos T RET após o TCTH, mesmo que por métodos diferentes à PCR, pode ser considerado relevante, pois podem auxiliar a determinar quais fatores afetam a RI, tanto relacionados ao pré quanto aos pós transplante. Para avaliar a produção tímica, uma metodologia alternativa é o monitoramento dos linfócitos T RET de fenótipo CD4⁺CD31⁺, por CFM. (GABALLA *et al.*, 2016). O que contribui para a avaliação da reativação tímica pós TCTH, especialmente para o acompanhamento de crianças em condições linfopênicas, tendo em vista que os linfócitos T RET, contém altos números de TRECs e telômeros preservados, indicando que essas células estão no início do seu desenvolvimento e não dividiram muitas vezes (JUNGE *et al.*, 2007).

Monitorar a função tímica é considerado de grande importância, uma vez que no timo ocorre maturação, diferenciação e seleção positiva e negativa dos linfócitos T. Métodos radiológicos podem medir o tamanho do timo, no entanto, estimar a efetividade tímica, mesmo que de forma semiquantitativa, é possível por CFM, através da expressão fenotípica CD31⁺ (VELARDI, *et al.*, 2021).

2.4 TIMOPOESE

O timo é o órgão responsável pela maturação das células linfoides T. A função tímica diminui em função da idade, mas conserva seu potencial de diferenciação das células T (REIS; VISENTAINER, 2004). Após o TCTH a reconstituição dos linfócitos T é um processo complexo, podendo ser dividido em duas fases: timo-independente ocorre nos primeiros meses, através da expansão periférica homeostática dos linfócitos T, infundidos juntos com o enxerto e que não foram eliminados com a imunossupressão, o enxerto contém linfócitos T virgens e de memória capazes de repor parte do compartimento de linfócitos T, com a reconstituição principalmente de linfócitos T CD8, fornecendo imunidade nos primeiros meses. (AZEVEDO, 2013; DEKKER *et al.*, 2020). Outra fase da reconstituição é timo-dependente, descrita como produção de novos linfócitos T, a partir de progenitores linfoides no timo. A reativação tímica é mais tardia, a reconstituição dos linfócitos CD4, portanto é mais lenta, podendo levar meses ou anos, depende da idade do paciente transplantado, fonte de CTHs e imunossupressão. Dessa forma, a timopoeise é um dos mecanismos de recuperação do “pool” periférico das subpopulações T, proporcionando renovação do repertório de receptores de células T (TCR) (VOLTARELLI, 2000; AZEVEDO, 2013).

A ação de fármacos imunossupressores, com intuito de impedir as manifestações da DECH e a rejeição as células do enxerto, diminui ou elimina células imunocompetentes do receptor, fato que provoca defeitos reconstituição inata e adaptativa, além de atraso na RI que podem levar paciente a maior incidência de infecções, principalmente virais e conseqüentemente menor sobrevida global. Reestabelecer o sistema imunológico, principalmente os linfócitos T CD4⁺ é crucial para bom resultado do transplante. (BERTANIA *et al.*, 2022)

No trabalho de Ligeiro (2016), a timopoeise foi avaliada pela identificação e quantificação das células T RET, definidas pela expressão da molécula CD31, o qual demonstrou dependência da idade. A quantidade de linfócitos T RET diminuiu

significativamente em pacientes no da final puberdade, de maneira acentuada em pacientes com idade avançada. A literatura sugere a importância dos linfócitos T REG após o transplante de medula óssea, para monitorar a reativação da função tímica, prejudicada pela ação mieloablativa e imunossupressora (JUNGE *et al.*, 2007; KOHLER; THIEL, 2008; GREINIX *et al.*, 2014).

Segundo Bertania, *et al.*, (2022), quantificações mais refinadas da RI, como a quantificação dos T REG, além de indicar, função tímica efetiva, com a nova produção de células T, uma vez que essas podem originar um repertório de células T diversificado, também podem estar associadas a diferentes respostas aos protocolos de imunoprofilaxia, visto que esses retardam a RI (BERTANIA, *et al.*, 2022)

2.5 COMPATIBILIDADE HLA (ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO)

Os principais genes envolvidos com compatibilidade celular ou tecidual, foram denominados de complexo principal de histocompatibilidade ou (MHC – *Major Histocompatibility Complex*), apresentam estruturas e funções diferente e se dividem em: classe I e II. Os genes humanos responsáveis pela rejeição de tecidos, tornou se genericamente mais conhecido por (HLA – *Human Leukocyte Antigens*) e estão localizados no braço curto do cromossomo 6, são excessivamente polimórficos, com expressão variada de glicoproteínas. O sistema HLA possui 6 genes que codificam as moléculas de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), reconhecidas em células nucleadas e plaquetas; e da classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP), identificadas em linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) (DARIO, 2016; MENEZES, 2019).

A compatibilidade entre os genes HLA (doador – receptor) é um fator genético diretamente relacionado ao sucesso em transplantes alogênicos, no que se refere à rejeição, tendo papel fundamental no sistema imunológico, uma vez que o sistema HLA é responsável pelo controle e codificação de moléculas presentes nas membranas celulares. Além disso, tem função de apresentação de antígenos peptídicos aos receptores de linfócitos T (TCR). As diferenças genéticas no sistema HLA entre doador e receptor estão associadas a falha do enxerto (DARIO, 2016). Diferenças em dois ou mais *locus* aumentam os riscos de DECH e mortalidade (PARK, SEO 2012).

Técnicas moleculares de tipificação do sistema HLA, permitem uma melhor/aperfeiçoada escolha de um doador para o TCTH. A tipificação do HLA consiste em identificar antígenos reunidos no (MHC), dos quais são avaliados os *locus* A, B, C, DR, DQ. As técnicas se diferenciam em baixa e alta resolução, a identificação da sequência de nucleotídeos de DNA, é realizada por PCR. Prioriza-se que a tipagem HLA para transplantes alogênicos não aparentados (NAP), seja de alta resolução para classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C); e para classe II, os alelos DRB1 e DQB1. A ausência de compatibilidade (*mismatch*) em DQB1, pode ser aceita quando compatível com (HLA-A, HLA-B e HLA-C e DRB1) (KOLINS *et al.*; BOFFO, 2014).

A possibilidade de conhecer detalhadamente o sistema HLA, favorece a seleção do doador (relacionado ou não relacionado) e uma melhor opção de plataforma de transplante (PASQUINI; COUTINHO, 2004; BOFFO, 2014). A busca por doador HLA compatível primeiro é feita na família, embora a probabilidade de encontrar um irmão totalmente compatível seja de apenas 25% (KOLINS, 2011). Caso não encontre doador compatível na família (aparentado), faz-se a busca por um doador não aparentado, através de informações contidas em bancos de medula óssea (REDOME, 2022).

Nos últimos anos, na ausência de doadores irmãos HLA idênticos/compatíveis, a seleção de doadores alternativos tem aumentado, sendo o transplante de células-tronco haploidêntico mais utilizado. Esta possibilidade facilitou o encontro de doadores familiares possíveis (mãe, pai, filhos), no qual apenas um haplótipo do doador é semelhante ao receptor (WANG, 2019; ZHANG; TEY, 2019). O uso de alta dose de ciclofosfamida pós TCTH haploidêntico (PT/Cy-haplo) é uma alternativa em relação a depleção de células “*ex vivo*”, para Nakamae, *et al.*, (2019) a dose Ciclofosfamida pós transplante, poderá diferenciar o perfil de RI dos linfócitos T, bem como contribuir para indução de tolerância imunológica.

2.6 CONDICIONAMENTO E IMUNOSSUPRESSÃO

Antes de ser submetido ao TCTH, o paciente passa por uma ablação praticamente total da medula óssea, esta etapa é denominada de regime de condicionamento pré-transplante, ou seja, um preparatório com a finalidade de destruir as células anormais, nos casos das doenças malignas (PASQUINI; COUTINHO, 2004; FONSECA; SECOLI, 2006). Essa etapa ocasiona aplasia medular

e preparará o local para receber o enxerto, criando espaço para que as CTHs infundidas, possam proliferar e se diferenciar. O regime é escolhido de acordo com o tipo da doença de base, condição clínica e idade do paciente. O regime de condicionamento mieloablativo é realizado pela associação de agentes quimioterápicos antineoplásicos (ciclofosfamida, bussulfano, fludarabina), geralmente altas doses e por irradiação corporal parcial ou total. O regime de condicionamento de intensidade reduzida (RIC) é realizado por antineoplásicos associados a fármacos imunossupressores, em doses reduzidas (bussulfano, fludarabina, micofenolato de mofetil, Campath, ATG), (PASQUINI; COUTINHO, 2004; FONSECA; SECOLI, 2006; GYURKOCZA; REZVANI; STORB, 2010). O regime de condicionamento é um dos fatores que influenciam a uma RI adequada ou tardia, principalmente dos linfócitos T CD4⁺, que pode se estender por meses ou anos (HOARE; *et al.*,2017).

A imunossupressão, imunoprofilaxia da DECH ou indução é realizada com fármacos imunossupressores, que por definição suprimem/inibem a resposta celular/humoral, tendo como finalidade prevenir a rejeição do enxerto pelas células imunocompetentes do receptor (SOARES *et al.*,2007).

A escolha do tipo de profilaxia da DECH é baseada na doença de base, incompatibilidade do HLA, condicionamento e as características do paciente. Os imunossupressores, conforme Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Imunossupressão (CONITEC, 2016), são classificados quanto ao mecanismo de ação em:

- Inibidores específicos da célula T ou inibidores da calcineurina: atuam pela inibição da calcineurina, proteína citoplasmática, que por meio de drogas como ciclosporina (CSA) e tracolimus, impedem a expressão da interleucina (IL-2), responsável por estimular o crescimento e diferenciação dos linfócitos T.
- Agentes citotóxicos ou fármacos antiproliferativos: a ação imunossupressora atua diminuindo a síntese dos precursores de nucleotídeos das bases púricas, que participam da síntese de DNA e RNA inibindo a expansão dos linfócitos T e B, como exemplos temos: metotrexato; inibidor da dihidrofolato redutase, o que acarretará a diminuição na produção de interleucinas, citocinas, interferon, fator de necrose tumoral (TNF), etc. O micofenolato de mofetila (MMF); inibidor reversível da desidrogenase da inosina monofosfato, enzima envolvida no ciclo celular, afeta a capacidade proliferativa dos linfócitos.

- Glicocorticoides: amplamente conhecidos e utilizados como imunossupressores e anti-inflamatórios em diferentes situações clínicas, entre eles: prednisona, prednisolona e metilprednisolona.
- Anticorpos imunossupressores: são fármacos de função terapêutica dirigida, considerados específicos, pois se ligam a moléculas da superfície linfocitária. O mecanismo de ação diminui a ação dos linfócitos circulantes, bloqueando sua função e conseqüente apoptose. O ATG (globulina anti-timocítica) é um anticorpo murino que atua contra a cadeia ϵ do CD3, uma molécula trimérica localizada na superfície dos linfócitos T humanos.

A imunossupressão faz com que o paciente necessite de maiores cuidados, porque o déficit imunológico favorece o surgimento de infecções bacterianas, virais e fúngicas, o que faz dessa etapa um período delicado pós TCTH (KOLINS *et al.*, 2011, GABALLA *et al.*, 2016).

2.7 DECH AGUDA

A DECH aguda, se caracteriza principalmente em relação aos sinais e sintomas e quanto ao acometimento dos órgãos, acontecem nos primeiros dias após o transplante, quando os linfócitos T do doador contidos no enxerto, desencadeiam uma reação imunológica contra antígenos de histocompatibilidade distintos, através da capacidade de se proliferarem e se diferenciarem, podendo ocasionar necrose tecidual (SOARES *et al.*, 2007). Desde 2005, a síndrome clínica foi definida como, “DECH aguda clássica” antes do D+100; a qual acomete um ou mais órgãos, principalmente: pele, fígado e trato gastrointestinal (TGI), (BOUZAS *et al.*, 2010). Conforme Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Imunossupressão (CONITEC, 2016), os fatores que desencadeiam os sintomas são: disparidade de compatibilidade HLA, sexos diferentes entre doador e receptor; fontes distintas de CTHs, regime de condicionamento e imunoprofilaxia. As manifestações clínicas mais comuns são:

- *Rash* maculopapular em: orelhas, ombros, plantas das mãos e dos pés. Sendo classificado quanto ao grau de envolvimento pela extensão e gravidade das lesões.

- TGI: pode agredir porções inferior e superior, causando náuseas, vômitos, diarreias, dores abdominais. Exames histopatológicos, endoscopias, colonoscopias podem confirmar a DECHa.
- Lesão Hepática: ocorre aumento das enzimas hepáticas (bilirrubinas e fosfatase alcalina).

Para avaliar o estadiamento e graduação da DECHa foi proposta em 1974 por Glucksberg e *cols.* Cada órgão afetado pode ser avaliado conforme o estágio de acometimento laboratorial ou clínico, enquanto que a graduação inicial serve para estimar a resposta ao tratamento e à profilaxia, sua classificação consiste em Grau 0 (nenhum), I (leve), II (moderado), III (grave), IV (com risco de morte). Algumas informações quanto ao estadiamento e a graduação da DECHa estão descritas no apêndice 1, conforme Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Imunossupressão pós transplante de Medula Óssea (CONITEC, 2016).

2.8 DECH CRÔNICA

A DECHc foi classificada em 1980 como limitada, atingindo pele e/ou fígado; ou extensa, comprometendo pele de forma limitada ou disseminada, associada ao comprometimento em outros órgãos (BOUZAS *et al.*, 2010). Acontece dentro do primeiro ano, mas podem se estender por anos pós transplante. A fisiopatologia consiste em inflamação, processos imunológicos e fibrose. Considerada como uma síndrome heterogênea de difícil diagnóstico e avaliação da gravidade e com o objetivo de melhorar a conduta clínica e terapêutica, o Consenso do *National Institute of Health* (NIH) 2005, padronizou os critérios que definem o diagnóstico de DECHc. No ano de 2014, tais critérios foram atualizados e pelo menos uma manifestação clínica confirmados por exames laboratoriais, exames de imagem, biópsia e avaliação com outras especialidades médicas. Os sinais e sintomas clínicos podem atingir: pele, unhas, boca, olhos, genitália, TGI, fígado, pulmões, músculos e articulações. Além de alterações hematopoiéticas (plaquetopenia, linfopenia), imunológicas (AHAI, PTI). É considerada a maior causa de morbidade e mortalidade tardia (CONITEC, 2016).

2.9 CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA (CFM)

A CFM é uma metodologia capaz de caracterizar e diferenciar fenotipicamente tipos celulares e avaliar intrinsecamente características como: conteúdo de DNA, RNA, receptores de atividade e fosforilação enzimática, citocinas, citotoxicidade, apoptose e outras. Essa técnica evoluiu desde a década de 50, quando primeiros contadores celulares automatizados surgiram, desenvolvido por Wallace Coulter, que realizavam apenas a contagem de hemácias e leucócitos (*Coulter Counter* modelo A, patenteado em 1957). Já na década de 60 a citometria de fluxo “moderna” se destacou com um equipamento capaz de separar células (*cell sorter*), desenvolvido por Mack J. Fulwyle, utilizando o princípio de Wallace Coulter, definindo o tamanho celular e desviando-as eletrostaticamente. O primeiro citômetro de fluxo que utilizou o *laser* argônio (488nm) como fonte luminosa ocorreu em 1969, desenvolvido por Paul Mullaney, que combinou a medição da dispersão da luz com a utilização de uma fluorescência, a qual denominamos de citometria de fluxo multiparamétrica (CFM). Com o passar do tempo outros compostos fluorescentes já conhecidos foram agregados a outros compostos e são denominados de *tandem*, ou seja, constituídos por duas moléculas ligadas entre si (BD, 2022). A possibilidade de mais fluorocromos, permitiu em um único ensaio a capacidade de utilizar outros marcadores fenotípicos, além da avaliação de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) (BERTHO; FERRAZ, 2013; HOLMBERG-THYDEN, *et al.*, 2021).

A imunofenotipagem por CFM é um método útil para diagnóstico, classificação, prognóstico, estadiamento, caracterização fenotípica das neoplasias hematopoiéticas, quantificação de CTHs, monitoramento da RI, entre outras aplicações (VOLTARELLI, 2000; SILVA; VASCONCELOS; SALES, 2013; CARDOSO; SANTO-SILVA, 2019; HOLMBERG-THYDEN, *et al.*, 2021). Baseia-se na determinação de parâmetros morfológicos e funcionais das células, por meio da detecção da dispersão da luz, quando interceptadas individualmente por fontes luminosas (lasers), em uma câmara especial (célula de fluxo) permitindo a possibilidade de avaliar vários parâmetros ao mesmo tempo. A fluorescência emitida por substâncias (fluorocromos) ligadas à superfície ou interior das células é detectada e gerada por anticorpos monoclonais marcados com os fluorocromos, e permitem a análise qualitativa e quantitativa de padrões de expressão de antígenos (*clusters of differentiations* – CDs) em populações celulares de interesse, sendo que cada tipo

celular expressa um padrão de CDs diferente. O uso de marcadores celulares/ anticorpos monoclonais (AcMo), auxiliam na qualificação e quantificação (caracterização) das células do sistema imunológico (BERTHO; FERRAZ, 2013; HOLMBERG-THYDEN, *et al.*, 2021). Os ensaios de imunofenotipagem celular se tornaram mais específicos e sensíveis, uma vez que os citômetros de fluxo também se transformaram em equipamentos mais robustos e confiáveis. A definição sistemática de painéis padronizados, equipamentos calibrados, compensados e otimizados permite a reprodutibilidade e confiabilidade da técnica de CFM (HOLMBERG-THYDEN, *et al.*, 2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo observacional, analítico, coorte não comparado, com coleta retrospectiva de dados.

3.2 HIPÓTESE

Considerando a natureza associativa dos estudos coorte, o TCTH por doenças hematológicas malignas ou não malignas foi posicionado como variável independente e a reconstituição imunológica dos linfócitos T RET como variável dependente, construindo assim as hipóteses.

H0: O TCTH HLA aparentado, não aparentado e haploidêntico em suas diferentes características (diagnóstico, condicionamento e imunoprofilaxia), não tem relação com a reconstituição imunológica dos linfócitos T RET.

H1: O TCTH HLA aparentado, não aparentado e haploidêntico em suas diferentes características (diagnóstico, condicionamento e imunoprofilaxia), tem relação com a recuperação imunológica dos linfócitos T RET.

3.3 LOCAL E PERÍODO

O estudo foi realizado por meio do Programa de Pós-Graduação da Saúde da Criança e do adolescente PPGSCA– UFPR. A coleta dos dados feita na Unidade de Oncologia Hematologia e Transplante (UOH) CHC-UFPR, no setor de Citometria de Fluxo da Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica (UACAP). No Serviço de TMO do Hospital Infantil Pequeno Príncipe (HPP), no Laboratório de Citometria de fluxo do HPP, pelo acesso aos laudos, no período de dezembro de 2020 a dezembro de 2022.

3.4 POPULAÇÃO FONTE

O CHC-UFPR realizou o primeiro transplante na América Latina em 1979 e atualmente uma média de 60 transplantes por ano. Também participaram deste estudo, pacientes que realizaram TCTH no Hospital Pequeno Príncipe, atuante nessa área desde 2011 e atualmente tem uma demanda de TCTH semelhante ao CHC-UFPR.

3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo os pacientes com idade até 17 anos completos, submetidos ao primeiro TCTH entre 2013 a 2020, com estudo das subpopulações linfocitárias com os marcadores de linfócitos T $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ e RETs ($CD31^+CD45RA^+$), linfócitos B $CD19^+$ e linfócitos *NK* $CD16^+CD56^+$, independente do sexo ou do diagnóstico, com sobrevida maior que 100 dias e que receberam infusão da medula óssea ou sangue periférico com pega do enxerto.

3.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

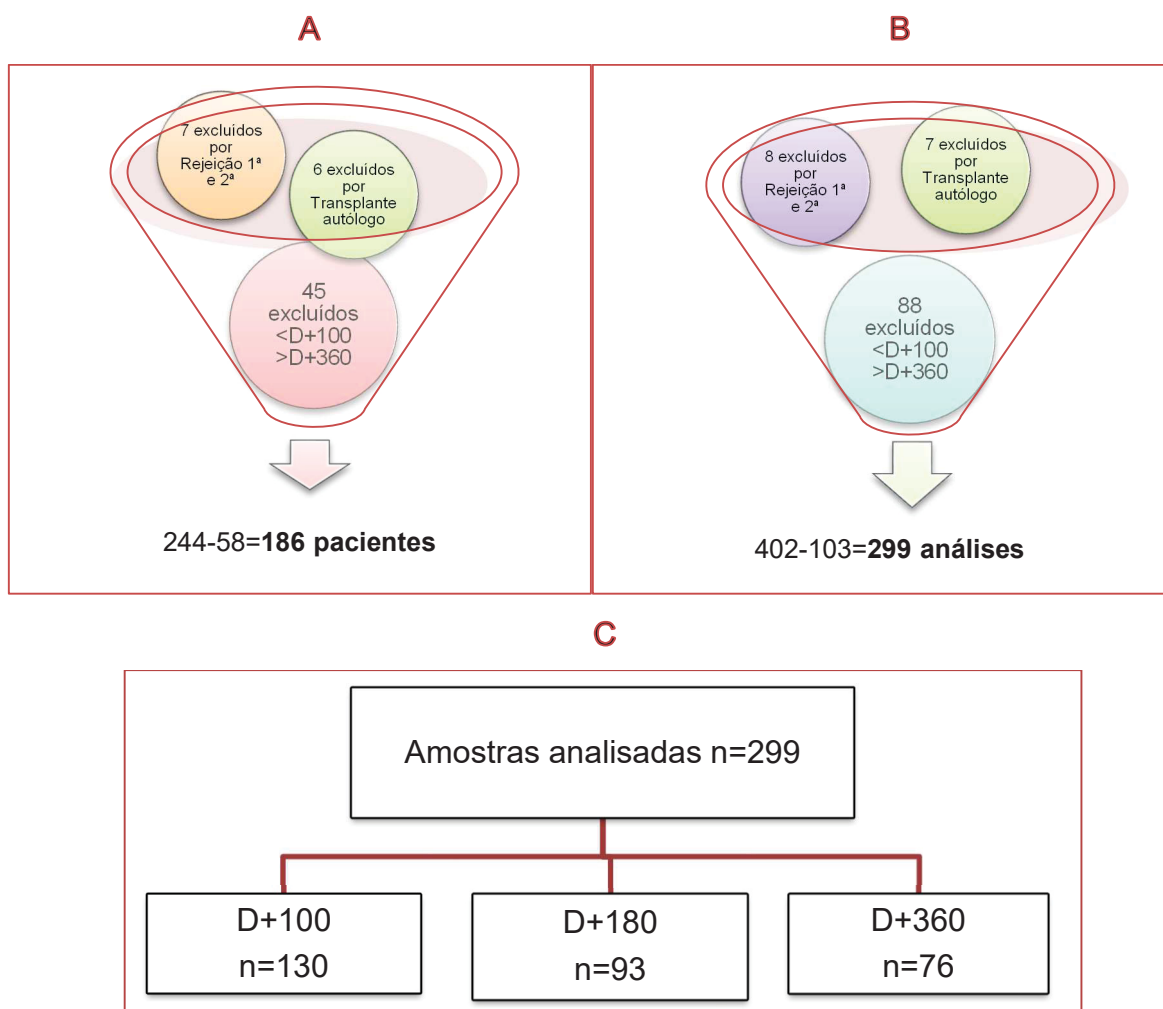
Foram excluídos deste estudo pacientes com exames ou prontuários com dados incompletos bem como resultados com falha nos “Ds” pós transplante, como análises inferiores ao D+100 e/ou superiores ao D+360, bem como pacientes que receberam CTHs de sangue de cordão umbilical (SCU), com rejeição do enxerto e que realizaram transplante autólogo.

3.7 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA

A seleção inicial foi de 244 pacientes com um total 402 amostras. Após a seleção com os critérios de exclusão, o número de pacientes foi de 186 e 299 amostras com análises das subpopulações linfocitárias as quais tinham no mínimo uma (1) análise dos linfócitos T RET, nos dias: D+100, D+180, D+360.

FIGURA 1 – População de estudo e amostra inicial (A) pacientes e (B) exames.

População de estudo e amostra final (C)



FONTE: A autora (2023).

3.8 VARIÁVEIS DE ESTUDO E DESFECHOS

- Pré-TCTH: Dados demográficos: idade, gênero, diagnóstico (doenças malignas, falências medulares, erros inatos da imunidade e erros inatos do metabolismo), fonte de CTH, tipo de doador, condicionamento (mieloablativo: MAC e intensidade reduzida: RIC), imunoprofilaxia da DECH, uso de r-ATG, uso de ICT, sorologia doador e receptor CMV.
- DESFECHOS Pós-TCTH: Pega neutrofílica, pega plaquetária, reativação por CMV, DECH aguda, DECH crônica e sobrevida global.

- c) DESFECHOS de RI: contagem absoluta de leucócitos, linfócitos e subpopulações (T, RETs, B e NK).

3.9 CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA UTILIZADA

As amostras foram processadas no período entre 2013 a 2017 e adquiridas nos Citômetros da Becton e Dickinson FACSCalibur™ e FACS Canto II.

Até 2017 foi utilizado o FACSCalibur™ composto de 02 lasers: azul (488nm) e vermelho (633nm) analógico, com quatro canais de fluorescência: FL1, FL2, FL3, FL4 que possibilitava em um único ensaio quatro marcadores fenotípicos, FSC e SSC. Os dados foram adquiridos por meio do programa BD CellQuest™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). A partir de 2017 foi utilizado o FACSCanto™ II que contém 03 lasers; azul (488nm), vermelho (633nm), violeta (405nm) com oito canais de fluorescência sendo identificados pelo laser azul: FITC (Isotiocianato de fluoresceína), PE (Ficoeritrina), PerCP, (Proteína peridina clorofila, PECy7 (Ficoeritrina e cianina Cy7); pelo laser vermelho: APC (aloficocianina), APC-H7 (aloficocianina H7); e laser violeta V450/Pacific Blue e V500c/Pacific Orange, tecnologia é digital, com maior sensibilidade e resolução. Os dados foram adquiridos no Software BD FACSDiva 6.1™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) (MS INCA, 2022).

A atualização de tecnologia, também aconteceu para os exames de RI que foram solicitados e realizados no HPP, os quais tivemos acesso apenas aos laudos. Os dados foram compilados numa tabela com os marcadores fenotípicos utilizados, para cada subpopulação linfocitária foram realizados os exames de RI no CHC e no laboratório de CFM.

As subpopulações linfocitárias foram quantificadas e caracterizadas pela expressão fenotípica: linfócitos T CD3⁺, T auxiliares CD3⁺CD4⁺, T citolíticos CD3⁺CD8⁺⁺, linfócitos B CD19⁺, linfócitos NK CD16⁺CD56⁺, T RET CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺ e RET CD8⁺CD31⁺CD45RA⁺, relativo e absolutos. Os painéis de anticorpos utilizados podem ser observados na Tabela 1. Abaixo exemplo de estratégia de análise de subpopulações linfocitárias, realizadas com o Software Infinicyt™ Cytognos, conforme ilustrado na Figura 2.

FIGURA 2 – Estratégia de análise de subpopulações linfocitárias utilizando o programa Infinicity 2.0.

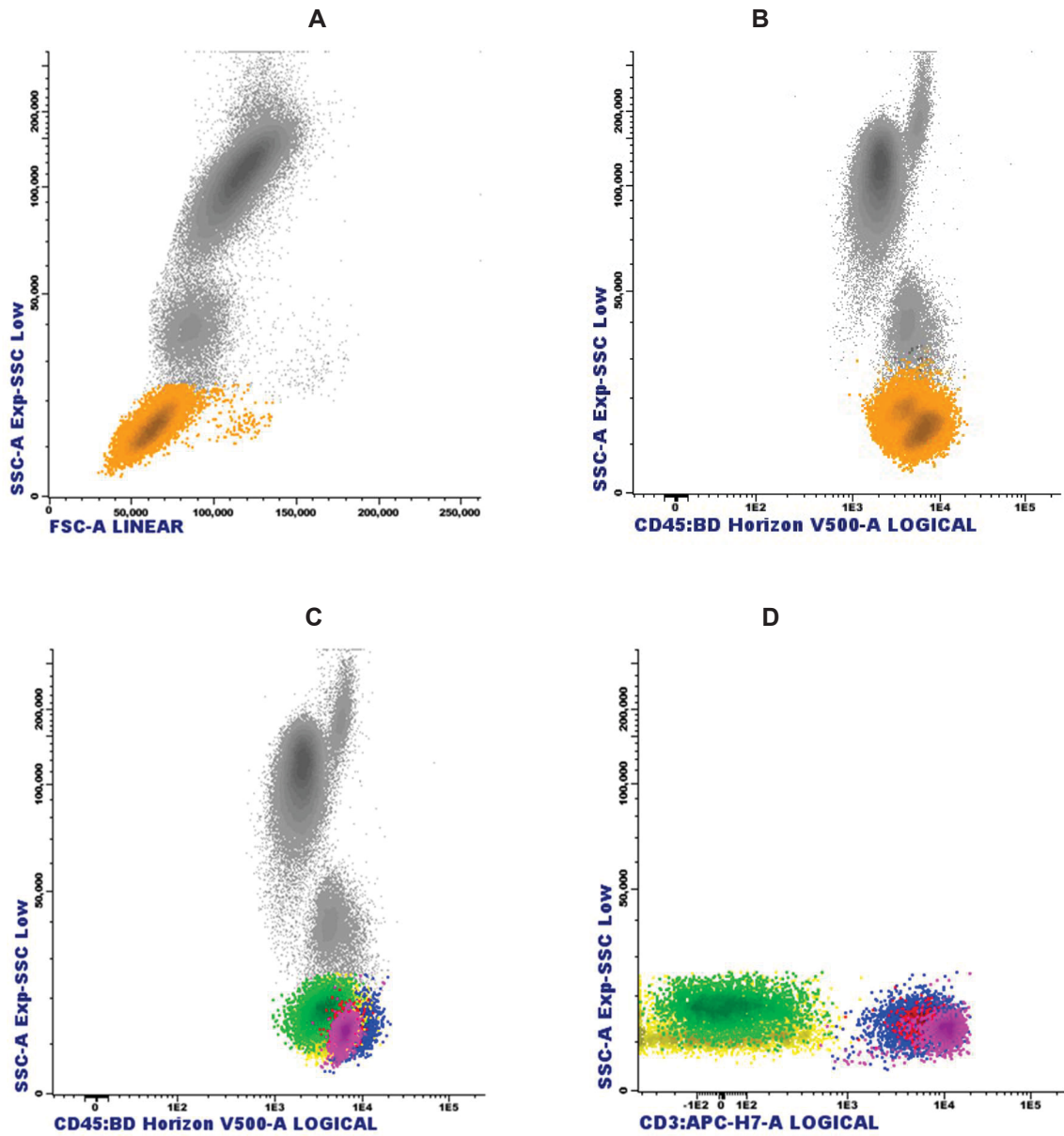
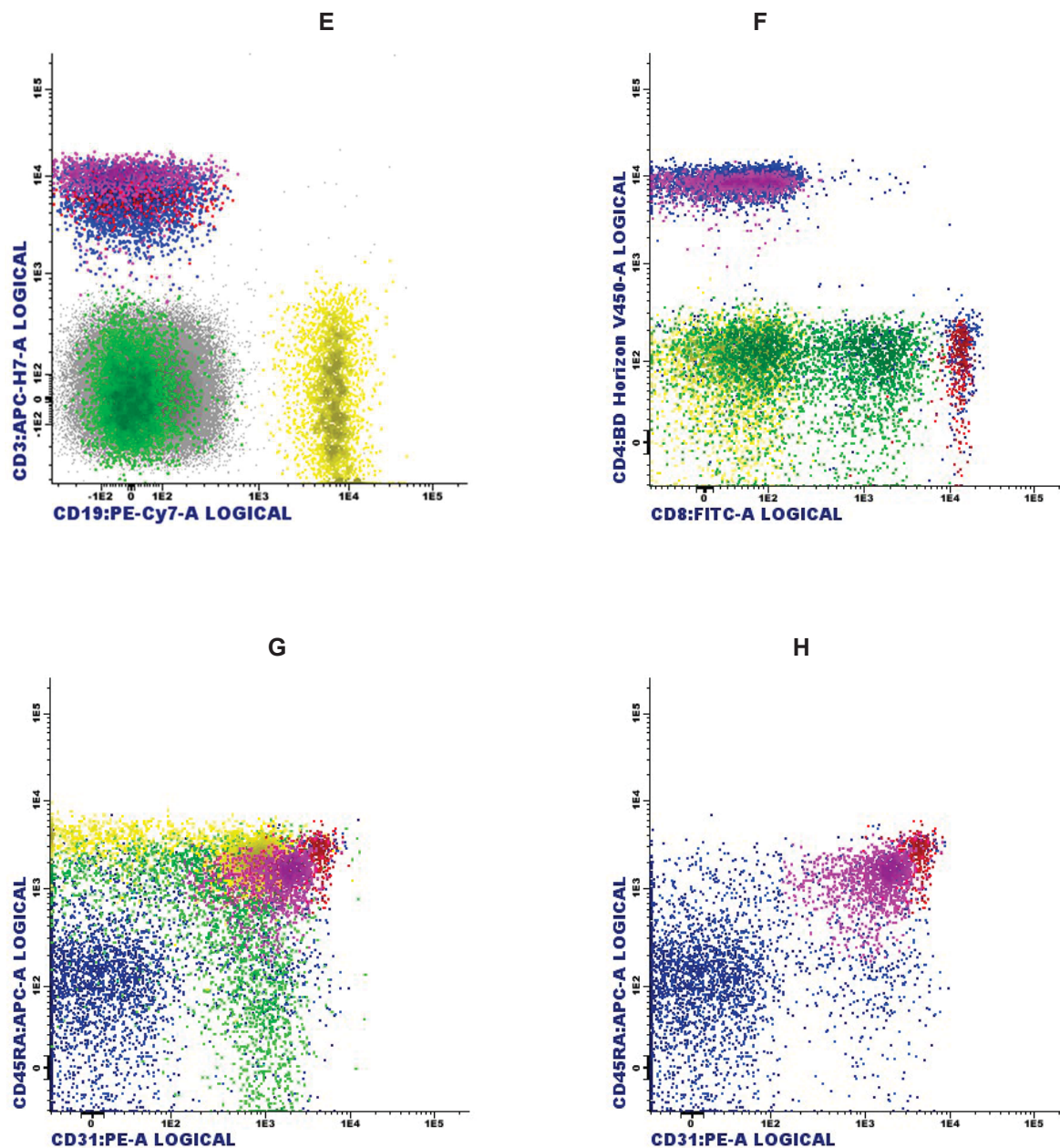


FIGURA 2 – Análise de subpopulações linfocitárias (continuação)



LEGENDA: (A) Retirada de *debris* celulares SSC-A x FSC-A, (B) *Gate* de linfócitos SSC-A x CD45+, (C) *Gate* de linfócitos SSC-A x CD45+ marcados pelos fenótipos de T, B e NK, (D) *Gate* de linfócitos SSC-A x CD3+, (E) *dot plot*- Linfócitos B CD19+ (amarelo) x Linfócitos T CD3+ (azul) e linfócitos NK verde; (CD3-CD19-), (F) *dot plot*- *Gate* linfocitário – linfócitos T CD4+ (rosa) e T CD8+ (vermelho), (G) *dot plot*- *Gate* linfocitário e RET CD4+ (rosa) e RET CD8+(vermelho), (H) *dot plot*- *Gate* linfócitos T e RET CD4+ (rosa) e RET CD8+ (vermelho).

Citômetro de fluxo -FACSCanto II™ BD Biosciences.

FITC (Isotiocianato de fluoresceína), PE (Ficoeritrina), PerCP (Proteína peridrina clorofila), PECy7 (Ficoeritrina – cianina7 conjugado tandem), APC (alofocianina), APC-H7 (Alofocianina H7), PB (Pacif Blue), V450, V500.

FONTE: A autora (2023).

TABELA 1 – Anticorpos monoclonais e fluorocromos utilizados no Citômetro BDFACSCalibur™ e Citômetro BDFACSCanto™ II.

SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS e PAINÉIS			
LINFÓCITOS	MARCADORES CELULARES	FLUOROCROMOS CLONE – MARCA	FLUOROCROMOS CLONE – MARCA
		FACS Calibur	FACS Canto II
T	CD3	FITC -SK7; APC- SK7 (BD)	FITC -SK7; APC-H7- SK7 (BD)
T auxiliares	CD4	PercP- SK3 (BD)	APC-SK3; V-450-SK7 (BD) CD4 PB-13B8.2 (BC)
T citotóxicos	CD8	APC- SK1 (BD)	FITC- HIT8a PercP- HIT8a; APC-SKI (BD)
RET CD4	CD4CD31CD45RA	CD45RA FITC-L48 (BD); CD31 PE-WM59 (BD)	CD45RA FITC-L48; APC-HI100; CD31 PE-WM59 (BD)
RET CD8	CD8CD31CD45RA		
B	CD19	PercP/PECy5- HIB19; APC-HIB19 (BD)	PercP/PECy7-SJ25T1; APC-HIB19 (BD)
NK (natural killer)	CD16CD56	CD16 FITC, PE-3G8 (BD) CD56 PE-N901(NKH-1) (BC)	CD16 PE-3G8 (BD) CD56 PE-N901(NKH-1) (BC)
T	CD3CD8CD45CD4 Multitest™	CD3 FITC-SK7, CD8 PE-SK1; CD45 PercP-2D1; CD4 APC-SK3 (BD)	CD45 PECy-5-HI30; V-500-HI30 (BD)

LEGENDA: BD (*Becton Dickinson-Biosciences*), BC (*Beckman Coulter*), (FITC (Isotiocianato de fluoresceína), PE (Ficoeritrina), PerCP (Proteína peridinina clorofila), PECy5 (Ficoeritrina – cianina5 conjugado tandem), PECy7 (Ficoeritrina - cianina7 conjugado tandem), APC (Aloficocianina), APC-H7 (Aloficocianina H7), PB (Pacif Blue), V450, V500.

FONTE: A autora (2023).

3.10 MÉTODOS E PROCEDIMENTOS DE ESTUDO

Todos os dados foram coletados de arquivos, prontuários físicos ou eletrônicos (SIH) do laboratório de Citometria de fluxo e dos ambulatórios da UOH do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - CHC/UFPR e no Serviço de TMO do Hospital Infantil Pequeno Príncipe (HPP) e Laboratório de Citometria de Fluxo do HPP.

3.11 TABULAÇÃO E GERENCIAMENTO DE DADOS

Todos os dados foram coletados e registrados exclusivamente pelo pesquisador com os resultados obtidos por meio da consulta de prontuários físicos e de banco de dados eletrônico, sendo em seguida registrados em planilha eletrônica - Excel, conferidos e exportados para *software Statistica* v.10.0 (Stasoft®).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por média, desvio padrão, mediana, mínimo, máximo e amplitude interquartil, além de variáveis categóricas que foram descritas por frequências absolutas e percentuais. Os tempos decorridos até a ocorrência de desfechos foram descritos por curvas de Kaplan-Meier. Para a comparação de grupos definidos pelas classificações de variáveis clínicas, em relação aos resultados dos marcadores de recuperação imunológica, foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste *post-hoc* de Dunn. A condição de normalidade de variáveis quantitativas contínuas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Para as comparações múltiplas feitas pelo teste de Dunn, os valores de p foram corrigidos por Bonferroni. Os dados foram organizados em planilha Excel® e analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.28.0.

3.13 ÉTICA EM PESQUISA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa – CEP, CHC-UFPR. O parecer consubstanciado está registrado com número CAAE: 21249219.6.0000.0096. Associação Hospitalar de Proteção Infância Dr. Raul Carneiro (HPP) CAAE: 21249219.6.3001.0097 (Anexo 1).

3.14 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada considerando as medidas de proteção, minimização de riscos confidencialidade, responsabilidade do pesquisador e da Instituição, de acordo com o compromisso firmado com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CHC- UFPR na ocasião de submissão do projeto.

3.15 FOMENTO PARA PESQUISA, PROFISSIONAL E INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE

A pesquisa não contou com fomento de agências financiadoras. Os custos foram financiados pelo próprio pesquisador, não havendo custos adicionais para a Instituição, sendo utilizada apenas a estrutura física da UOH e do setor de Citometria de fluxo.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Esta dissertação foi escrita de acordo com o Regimento do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (PPGSCA-UFPR), de 14 de outubro de 2019, o qual prevê que dissertações de mestrado podem ser apresentadas de acordo com o modelo “misto”, anexando um artigo original relacionado à pesquisa, em substituição ao modelo “tradicional” conforme o Manual de Normalização de Documentos Científicos da UFPR.

Durante a elaboração desta dissertação alguns dados e resultados foram submetidos e aceitos, para apresentação oral no Congresso da Sociedade Brasileira de Terapia Celular e Transplante de Medula Óssea (SBTMO) publicados no *Journal of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy* (JBMTCT), em 2022 e 2023, seguem links abaixo.

<https://www.jbmtct.com.br/seer/index.php/jbmtct/issue/view/12/14>

<https://www.jbmtct.com.br/seer/index.php/jbmtct/issue/view/17/20> .

Além da produção de um artigo científico submetido na Revista *Cytotherapy* em 17 de setembro, 2023.

Immune Recovery and the Role of Recent Thymic Emigrated T lymphocytes after Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation

AUTHORS

Julie Lillian Pimentel Justus, Miriam P. Beltrame, Ana Paula de Azambuja, Yara C. Schluga, Edna A. Martins, Maria Tadeu Lemes Rocha, Adriana Mello Rodrigues, Gisele Loth, Alberto Lima, Carmem Bonfim.

ABSTRACT

Introduction: Adequate reestablishment of thymopoiesis is critical for long-term immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation (HCT), potentially impacting patient survival rates. This study aims to evaluate immune reconstitution (IR) in pediatric HCT recipients by quantifying recent thymic emigrants (RTE), specifically CD3⁺CD31⁺CD45RA⁺ cells. **Methods:** Retrospective analysis of 186 pediatric patients transplanted between 2013 and 2020, with immune recovery evaluation at three time points: D+100, D+180 and D+360 after HCT. We analyzed the distribution of peripheral blood subsets of T, B and natural killer (NK) lymphocytes and assessed the impact of underlying disease, HCT type, stem cell source, recipient age, conditioning regimen, graft versus host disease (GvHD) occurrence and cytomegalovirus (CMV) reactivation on immune recovery. **Results:** At D+100, patients under 10 years exhibited higher RTE CD4⁺ and RTE CD8⁺ counts compared to older patients (5.3/ μ L vs 2.2/ μ L, $p=0.022$), and (48/ μ L vs 72.8/ μ L, $p=0.049$), respectively. Patients receiving a haploidentical HCT had a lower RTE CD4⁺ counts compared to those with unrelated or related donors (2.4/ μ L, vs 4.4/ μ L vs 7.9/ μ L, $p=0.024$), respectively. Administration of rabbit anti-thymocyte globulin (ATG) negatively impacted RTE CD4⁺ production (median 6.5/ μ L vs. 2.4/ μ L, $p=0.007$). At **D+180**, the presence of GvHD had a negative influence on RTE production (11.7/ μ L, vs 56.8/ μ L $p<0.001$), particularly with higher-grade acute GvHD (without-56.8/ μ L; Grades I- II: 28.1/ μ L; Grades III – IV: 6.0/ μ L, $p<0.001$). Patients with CMV reactivation had a higher RTE CD8⁺ (median 204.6/ μ L vs 100.2/ μ L, $p=0.022$) compared to those without reactivation. At **D+360**, no variables significantly affected RTE recovery. Overall survival at 5-year follow-up was 87.7%, with a median of 1170 days (122 to 3316 days). Multivariate analysis showed that age>10y ($p=0.038$), negative CMV donor serology ($p=0.0029$), and acute GvHD ($p=0.0026$) had a negative impact on survival. **Conclusion:** This

study highlights variations in RTE production based on patient age, donor type and immunosuppression regimen employed.

Keywords: immune recovery, recent thymic emigrants (RTE), hematopoietic cell transplantation, flow cytometry.

INTRODUCTION

Hematopoietic cell transplantation (HCT) is a potentially curative procedure used as a treatment for various malignant and non-malignant hematological diseases (ARMITAGE, 1994; GYURKOCZA; REZVANI; STORB, 2010). Although the efficacy and safety of HCT have increased in recent decades, the balance between conditioning therapy immunosuppression donor type, age, graft source and especially HLA compatibility are factors that influence post-transplant immune reconstitution (IR) (ADMIRAAL, et al., 2016; HOARE, et al., 2017; DEKKER, et al., 2020). Functional T-cell immune reconstitution is a central factor for the success of HCT (WALLER et al., 2019). Thymus-independent T-cell reconstitution occurs in the first days after transplantation, through peripheral expansion of donor T lymphocytes that have resisted to conditioning and immunosuppression (CHAUDHRY et al., 2017). Although these cells have a restricted or dysfunctional repertoire, they can still protect the patient against infection (JANECZKO-CZARNECKA, et al., 2020). The pathway that establishes effective and long-term IR is a thymus-dependent pathway, or thymopoiesis, which is able to generate a diverse *pool* of T lymphocytes in functional T cell receptors (TCR) (DEKKER et al., 2020; JANECZKO-CZARNECKA, et al., 2020). There are several factors that affect or delay thymopoiesis after transplantation. The age of the recipient and underlying disease are non-modifiable factors with respect to reconstitution of thymic function (BERTAINA et al., 2022). On the other hand, the intensity of conditioning, the use of total body irradiation (TBI) and graft-versus-host disease (GvHD) immunoprophylaxis are modifiable risk factors, which may still result in thymus gland (stromal compartment) injury and in a drastic reduction in thymic function (CHAUDHRY et al., 2017, DEKKER, et al., 2020, VELARDI et al., 2021).

Multiparametric flow cytometry (MFC) enables identification and quantification of T lymphocytes subpopulations, allowing a better understanding of each patient's immune status. It is well-known that T-cell CD4 antigen is a simple biomarker that can be used in any transplant platform (VAN ROESSEL et al., 2020; BERTAINA et al., 2022). A recent study showed that a CD4⁺ threshold of 50/ μ L in the first 100 days after transplantation was a predictor of overall survival in patients with grade III and IV GvHD (KONING et al., 2021).

The virgin or naive T-lymphocyte compartment, where recently emigrated T-lymphocytes (RTE) from the thymus are found, is phenotypically heterogeneous. These cells with a naïve phenotype can be measured semi-quantitatively in MFC through the co-expression of CD31 (PECAM-1) and CD45RA antigens on CD4⁺ T cells (KOHLER; THIEL, 2009; BELTRAME, 2013; GABALLA, et al., 2016; DEKKER et al., 2020). RTE levels decrease as a result of significant thymic damage and increase slowly from months to years after transplantation, correlating with thymic recovery (VELARDI et al., 2021). In this context, we analyzed T-cell subsets and RTE levels to verify immune reconstitution in pediatric patients, comparing with modifiable and non-modifiable variables post HCT.

METHODS

Study design

This retrospective clinical study was conducted in Curitiba, Brazil. Inclusion criteria encompassed pediatric patients who had undergone a first allogeneic HCT for various malignant and non-malignant diseases between 2013 and 2020 with at least one CD31⁺CD45RA⁺ RTE lymphocyte subpopulation analysis after 3 months and within the first year following their HCT.

Definitions

Neutrophil engraftment was defined as counts more than $0.5 \times 10^9/L$ in consecutive 3 days, and the platelet engraftment as counts exceed $20 \times 10^9/L$ without transfusion in consecutive 7 days. Acute graft-versus-host disease (aGvHD) and chronic GvHD (cGvHD) were diagnosed and graded according to standard criteria (HOLLER, GREINIX, ZEIZER, 2019).

Overall survival (OS) was defined as the time from transplantation until the date of death or last follow-up contact. GvHD prophylaxis treatment for related donors (RD) or unrelated donor (URD) was based on cyclosporine-A (CSA) combined with short course methotrexate (MTX) or CSA, Cyclophosphamide (Cy) and Micophenolate (MMF). All haploidentical hematopoietic cell transplantation were performed using the posttransplant cyclophosphamide platform (Haplo-PTCy) in association with CSA and Mycophenolate Mofetil. Rabbit Anti-thymocyte globulin (r-ATG) was added mainly for alternative donor transplantation.

Data collection

The patient's baseline characteristics were collected from electronic patient records. This data includes date of birth, age, sex, transplantation date, diagnosis, conditioning regimens (r-ATG and Total Body Irradiation; TBI), donor type, stem cell source, CMV reactivation and occurrence of acute and/or chronic GvHD. The longitudinal data comprising of cell counts of RTE were automatically extracted from the laboratory database. Multiparameter flow cytometry (MFC) study to monitor immunologic recovery was performed on days D+100, D+180 and D+360.

Participant's characteristics

In this study, 186 patients were included, 114 (61.3%) males; median age 7.8 years (2 months -17.86 years), being 126 (67.7%) aged 10 years or less. The distribution of patients according to underlying disease showed 76 (40.9%) malignant diseases (acute leukemia n=73, other malignant diseases n=3) and 110 (59.1%) non-malignant diseases, being 69 (37.1%) bone marrow failures (Fanconi anemia n=42, severe aplastic anemia n=20 and others n=7), inborn errors of immunity 34 (18.3%) and 7 (3.8%) inborn errors of metabolism. In this cohort, 35 (18.8%) received stem cells from related donors (RD), 88 (47.3%) from unrelated donors (URD) and 63 (33.9%) were transplanted from haploidentical donors. Bone marrow was the stem cell source in 91%. Among the patients, 102 (54.8%) received a myeloablative while 84 (45.2%) a reduced intensity conditioning regimen. Additionally, 101 patients (54.3%) received r-ATG, and 93 patients (50.0%) received total body irradiation (TBI). Among those who received TBI, 59 patients (31.7%) received a dose exceeding 400 cGy, while 34 patients (18.3%) received a dose ranging from 200 to 400 cGy. GvHD prophylaxis was administered as follows: CSA + Methotrexate (MTX) in 101 (54.3%) individuals, CSA + PTCy + MMF in 73 (39.2%) individuals, and CSA in combination with other drugs in 12 (6.5%) individuals. All patients included in this cohort achieved complete neutrophil recovery, with a median time to neutrophil engraftment of 19 days (range:12-154 days) and platelet engraftment of 22 days (range:10-136). The patient cohort characteristics are shown in Table 1.

Flow cytometry sample preparation, staining and analysis

Absolute white blood cells (WBC) and lymphocyte counts were calculated using a dual platform approach by multiplying the percentage of each lymphocyte subset by flow cytometry and the absolute leukocyte count obtained in a Sysmex XN-2000 XN™ hematology analyzer.

Multiparameter flow cytometry were performed in 4-5 mL of peripheral blood sample (PB) collected in 7.5% K3 EDTA anticoagulant, processed and analyzed within 24 hours.

The samples were acquired on FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences) using BDCellquest (BD Biosciences) from 2013 to 2017, or FACSCantoII™ (BD Biosciences, San Jose USA) using FACS-Diva software (BD Biosciences), from 2017-2020. Standard operating procedures were followed to assess MFC data, including standardized flow cytometer set up, performance checks and generation of compensation settings (KALINA et al., 2012).

Panel designed and fluorescent-labeled antibodies are outlined in more detail above: FACSCalibur™ - tube 1 (CD3-FITC, CD8-PE, CD45-PerCP, and CD4-APC); tube 2 (CD16-FITC, CD56-PE*, CD19-PerCP, CD3-APC); tube 3 (CD45RA-FITC, CD31-PE, CD4-PerCP, CD8-APC). FACSCanto II™ - tube 1 (CD16-FITC, CD56-PE*, CD19-PE-Cy7, CD8-APC, CD3-APC-H7, CD4-V450, CD45-V500c); tube 2 (CD8-FITC, CD31-PE, CD27-PC5*, CD19-PE-Cy-7, CD45RA-APC, CD3-APC-H7, CD4-V450, CD45-V500c). The reagents were from BDBiosciences, except for CD56-PE and CD27-PC5 from Beckman-Coulter, Brea, CA, USA). Data were analyzed with Infinicyt™ Software (Cytognos, Salamanca, Spain) or Paint-a-Gate™ respectively. Analysis of these tubes allowed evaluation of the frequencies of total T-cell lymphocytes CD3⁺ as well CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺ and CD16⁺CD56⁺ subpopulations. Recent thymic emigrants (RTE) were defined by the co-expression of CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺ or CD8⁺CD31⁺CD45RA⁺. Lymphocytes and RTE subsets were analyzed in absolute values (median, minimum, and maximum). An example of strategy of analysis in on Figure 1.

Statistical analysis

Descriptive analysis statistics were used to summarize baseline patient and transplantation characteristics. Continuous variables were described by mean, standard deviation, median, minimum, and maximum and compared with the non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests. The categorical variables were described by absolute frequency and percentages. OS was estimated using the Kaplan-Meier method and compared among groups using the log-rank test. Univariate competitive risk analyses were performed with cumulative incidence curves and compared among groups using Gray's test. The multivariate analyses were performed with Fine-Gray competing risk regression or Cox proportional hazards regression

models. for d+100, we analyze survival and cumulative incidence of GvHD and CMV reactivation using the thresholds CD4⁺ above 50 cells/ μ L [11, 9], CD4⁺ and RTE CD4⁺ above the median of this cohort. a 2-sided P value <0.05 was considered statistically significant. Data were organized in an Excel® spreadsheet and analyzed with the IBM SPSS statistics v.28.0 computer program and EZR v.1.53.

Ethic statement

This study was conducted in accordance with the principles of Declaration of Helsinki. The protocols were approved by Institutional Review Board of the Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná and Hospital Infantil Pequeno Príncipe (Curitiba, Paraná, Brazil).

RESULTS

Immunological recovery

Total CD3⁺ T lymphocytes, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, B lymphocytes CD19⁺, NK lymphocytes CD16⁺CD56⁺ and the evaluation of RTE CD4⁺ and RTE CD8⁺ cells were performed at days D+100 (n=130), D+180 (n=93) and D+360 (n=76). The median number of RTE CD4⁺ was 4.3 cells/ μ L, 41 cells/ μ L and 96 cells/ μ L, on days D+100, D+180 and D+360, respectively, while the median number of RTE CD8⁺ was 61 cells/ μ L, 138 cells/ μ L and 260 cells/ μ L, (Table 2).

Age of patients

Considering age, when patients older or younger than 10 years are grouped, we observed differences at D+100 in the quantity of T CD3⁺ lymphocytes (572 vs 396, $p=0.029$) and LT CD4⁺ (162 vs 90, $p=0.002$), but not for LT CD8⁺ (352 vs 288, $p=0.192$). Beside this, patients younger than 10 years had higher RTE CD4⁺ and RTE CD8⁺ counts, compared to older patients (5.3/ μ L vs 2.2/ μ L, $p=0.022$, and 48/ μ L vs 72.8/ μ L, $p=0.049$, respectively) (see Figure 2). At D+180 assessment, median RTE CD4⁺ lymphocyte counts were similar for patients aged above or below 10 years (22.0 cells/ μ L vs 53.1 cells/ μ L, $p=0.078$). Additionally, at D+360, the quantifications of RTE CD4⁺ were statistically similar (171.6 cells/ μ L vs 60.7 cells/ μ L, $p=0.096$) (Refer to Table S2). There was no significance in most of the variables studied at the three-time points in RTE CD8⁺, except for age at D+100 (72.8/ μ L vs 48/ μ L, $p=0.049$). These results are showed in Figure 2.

Donor type

The RTE CD4⁺ population on day D+100 was higher in patients receiving transplants from RD than haploidentical donors (7.9 cell/ μ L vs 2.4 cell/ μ L, $p=0.024$) Figure 3. In the study two by two comparisons performed according to donor type, there was a difference between the RD and Haploidentical donors ($p=0.026$), but no difference between RD vs URD ($p=0.409$) or URD vs Haploidentical ($p=0.229$). On days 180 and 360 there were no differences between donor types in analyses of RTE CD4⁺ and RTE CD8⁺ (Table S2).

GvHD prophylaxis

At D+100, the median RTE CD4⁺ recovery was 6.5/ μ L (range: 0.0 - 115) in patients who did not receive r-ATG (n=52), while it was 2.4/ μ L (range: 0.0 - 82.9) in patients who received r-ATG (n=78), $p=0.007$ (see Figure 2). However, analyses conducted at D+180 and D+360 did not yield significant results (Refer to Table S2). Furthermore, there were no differences in the analyses of RTE CD8⁺ lymphocytes.

Acute GvHD

The 100-day cumulative incidence (CI) of aGvHD was 0.269 (95% CI: 0.207-0.334), with a median onset occurring at 30 days (range:13-214). Among patients with aGvHD, 30 patients (16.1%) experienced grade (I-II), while 22 patients (11.8%) experienced grade (III-IV).

There was no difference in the levels of RTE CD4⁺ lymphocytes on D+100 in relation to the presence of aGvHD ($p=0.301$). However, patients with aGvHD grade (III-IV) exhibited RTE CD4⁺ counts at 1.9/ μ L (range: 0.0 - 17.5), whereas those with grade (I-II) had a median of 5.4/ μ L (0.2 - 82.4, $p=0.056$) (Refer to Table S2).

On D+180, patients with aGvHD, regardless of severity, displayed lower RTE CD4⁺ counts: grade (I-II) with a median of 28.1/ μ L (range: 0.2 – 279.6) and grade (III-IV) with a median of 6.0/ μ L (range: 0.0 – 65.5). In contrast, patients without aGvHD exhibited a notably higher median count of 56.8/ μ L (range: 1.0 – 505.2), demonstrating a significant difference ($p<0.001$) (refer to Table S2).

For patients assessed on D+360, there were no significant differences regarding the presence ($p=0.064$) or the degree of aGvHD ($p=0.096$). Additionally, no significant differences in RTE CD8⁺ analyses were noted on days 100, 180, and 360.

CMV Reactivation cumulative incidence

CMV reactivation occurred at a median of 36 days (range:9 -125), with a 100-day cumulative incidence of 0.578 (95% CI: 0.503-0.646). No significant differences were detected in the analysis of RTE CD4⁺ counts on D+100, D+180 or D+360 in relation to CMV reactivation (Refer to Table S2). However, when evaluating RTE CD8⁺ lymphocytes, we observed that patients who reactivated CMV had a higher median count on D+180 compared to those who did not reactivate CMV (median 204.6/ μ L vs 100.2/ μ L, $p=0.022$). No statistically significant differences were identified at other time points.

Outcome and survival

The median OS was 1170 days (range: 122 to 3316 days), with 1-year survival of 0.951 (95% CI: 0.908-0.974), 3-years survival of 0.925 (95% CI: 0.873-0.956) and 5-year survival of 87.7% (95% CI: 0.802-0.925). Eighteen patients died, 9 with malignant and 9 with non-malignant diseases. The main causes of death were toxicity-related mortality (12), GvHD (3) and relapse (3).

In the univariate analysis, patient age ($p=0.045$), CMV-positive donors ($p=0.0145$), and the presence of aGvHD ($p=0.014$) were significant for OS survival. No statistically significant differences were observed when comparing patients with malignant or non-malignant disease diseases ($p=0.608$), MAC vs RIC ($p=0.931$), and other pre-transplant characteristics. In the multivariate analysis, patients older than 10 years (HR = 2.69, range 1.06-6.84, $p=0.038$); CMV-negative donors ($p=0.0029$ HR = 4.89 (1.72-13.93), and aGvHD (considered as a time-dependent variable) ($p=0.0026$ HR = 4.49 (1.69-11.92), remained significant predictors of OS.

CD4⁺ T lymphocytes thresholds and outcomes

In this cohort, there were no significant differences in the OS in relation to CD4⁺ T lymphocytes thresholds, whether the threshold was set above and below 50 cells/ μ L at D+100 ($p= 0.54$), exceeded or fell below the median CD4 value observed at this time point (129 cells/ μ L, $p= 0.31$), or below the median RTE CD4⁺ lymphocytes (4.3 cells/ μ L, $p= 0.67$). Similarly, at D+180, the median value of RTE CD4⁺ lymphocytes (41 cells/ μ L, $p=0.43$) did not yield significant differences in OS (see Figure 3).

Discussion

Immune reconstitution post-HCT plays a pivotal role in patient outcomes and survival by affecting susceptibility to opportunistic infections and GvHD (BOELENS; HOSSZU; NIERKENS, 2020). Prior studies indicate that post-transplant T cells are derived from both mature T lymphocytes present in the donor graft and de novo-developed T lymphocytes from transplanted donor hematopoietic stem cells (TOUBERT et al., 2012, BATH, BEDNARKI, 2020). We and others (BELTRAME, 2013, GREINIX et al., 2014, GABALLA et al., 2016) have previously shown that the reappearance of naïve CD31⁺ RTEs after HCT correlates with the recovery of thymic function and the reconstitution of a diverse T-cell repertoire. In this study, we analyzed the IR focusing on RTEs cells, in a large cohort of pediatric patients undergoing their first allogeneic HCT for various diseases. Given previous findings indicating delayed immune reconstitution with increasing age (JANECZKO-CZARNECKA, et al., 2020; DROZDOV et al., 2022), the re-emergence of RTE cells and normalization of thymic function in children and adolescents post-allogeneic HCT are particularly pertinent in the transplant context (TOUBERT et al., 2012, DEKKER et al., 2022). Therefore, we conducted immune recovery analyses stratified by patient age (under and over 10 years), highlighting age-related effects, especially in T cell subsets and RTE cells.

It is well-known that the conditioning regimen given during HCT has the potential to impact thymopoiesis due to the damaging effects of chemotherapy and TBI on thymic tissue integrity (VELARDI et al., 2021; VELARDI et al., 2021). A study similar to our current analysis assessed post-transplant thymic function by examining RTE lymphocytes and identified statistically significant differences on days D+90 and D+180 between transplants involving related and unrelated donors (JANECZKO-CZARNECKA, et al., 2020).

In this study, it was observed that patients who received haploidentical transplants exhibited a reduction in the RTE population compared to patients transplanted from related or unrelated donors. This finding aligns with the results reported by Nakamae et al. in 2019. These authors evaluated T lymphocyte subpopulations among related, unrelated and haploidentical donors and demonstrated that the rate of immune recovery was also slower in haploidentical transplants, possibly due to the depletion of these cells when the haplo-PTCy platform was used. In addition, RTE cell counts at D+100 were lower in patients receiving r-ATG, but were not different between patients who received myeloablative and reduced intensity transplants as reported by FEDELE et al., 2012.

Our findings indicate that patients who experienced CMV reactivation had a higher number of CD8⁺ RTE lymphocytes at Day 180 (D+180). This observation suggests that the

proliferation and expansion of these CD8⁺ RTE cells may be linked to the immune response elicited by active CMV infection. This association between CMV and CD8⁺ T lymphocyte expansion aligns with the findings of another study conducted by KANAKRY et al. in 2016. These authors demonstrated that recipient seropositivity alone was sufficient to trigger the expansion of these lymphocytes, regardless of CMV reactivation after transplantation (KANAKRY, et al., 2016). In addition, our study identified differences in RTE in relation to the presence and severity of GvHD at Day 180 (D+180). However, it is important to note that RTE count was not a predictor for survival.

The participants in this study exhibited a better overall survival compared to other pediatric cohort studies with heterogeneous clinical characteristics. However, the present study excluded patients who died within 3 months post HCT, which may explain the higher overall survival compared to other studies (MORANDO et al., 2010). Koning et al. demonstrated that achieving overall reconstitution of CD4⁺ T cells (with a threshold of 50 cells/ μ L) within 100 days post-transplantation or prior to the onset of GvHD enhances the likelihood of survival (KONING et al., 2021).

And recently, CD4 and CD19 subsets were associated with a lower risk of relapse in the acute myeloid leukemia subgroup (LUCAS et al., 2023).

It is important to acknowledge the inherent limitations of this retrospective study. In the present analysis, we were unable to establish a direct correlation between the reconstitution of recent thymic emigrants (RTE) and clinical outcomes, including overall survival after HCT. Neither the median absolute counts of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes nor the RTE CD4⁺ lymphocyte subpopulations proved to be predictive of overall survival. These findings should be considered in the context of the study's retrospective nature and the inclusion criteria, which focused on patients who survived beyond Day+100 post-HCT. Furthermore, as Brazil is a huge country, many patients rely on government support for long-distance travel, which led to challenges in controlling sample collection at specific time-points, resulting in some missing data. Nonetheless, it is important to note that this study offers real-life insights. It primarily involves patients from a public health system hospital in a region where limited data exists on immune recovery after pediatric transplantation, underscoring the importance of such research in resource-constrained countries.

In summary, our study shows that the production of RTE varies among pediatric patients and can be influenced by factors such as the patient's age, donor type and the use of r-ATG. Therefore, our comparison of RTE dynamics, based on naive T cells expressing CD31 markers, across various pediatric diseases treated with HCT, adds to our understanding of T

cell reconstitution. It highlights the potential for enhanced thymic function recovery in children under the age of 10 years. Moreover, it presents an opportunity to standardize assessment panels and protocols for RTE-reconstitution in pediatric HCT, particularly in countries with limited resources. Such standardization should facilitate a more comprehensive analysis of the impact of underlying diseases, conditioning toxicity, GvHD prophylaxis and disease on long-term thymic function.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the flow cytometry laboratory team for their technical assistance, especially Noely T. Silva. We would like to thank the medical team at the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation, CHC-UFPR.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was performed in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

- ADMIRAAL, R. *et al.* Excellent T-cell reconstitution and survival depend on low ATG exposure after pediatric cord blood transplantation. **Blood**, v.128, dez. 2016.
- ARMITAGE, J. O. Bone marrow transplantation - Medical Progress. **The New England Journal of Medicine**, v.330, p. 827-838, 1994.
- BHATT, S. T; BEDNARSKI, J. J. Immune Reconstitution in Pediatric Patients Following Hematopoietic Cell Transplant for Non-malignant Disorders. **The Journal Frontiers in Immunology**. v.11, aug. 2020.
- BELTRAME, M. P. Immune Reconstitution in patients with Fanconi anemia after allogeneic bone marrow transplantation. **ISCT CYTOTHERAPY**, 2014.
- BERTAINA, A. *et al.* An ISCT Cell Engineering Committee Position Statement on Immune Reconstitution: the importance of predictable and modifiable milestones of immune reconstitution to transplant outcomes. **ISCT CYTOTHERAPY**, 24, p. 385-392, 2022.
- BOELENS, J. J.; HOSSZU, K. K.; NIERKENS, S. Immune Monitoring After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Toward Practical Guidelines and Standardization. **Frontiers in Pediatrics**, v.8, n. 454, ago. 2020.

CHAUDHRY, M. S. *et al.* Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Time to Up the Thymus. **The Journal of Immunology**, v.198, p.40-46, 2017.

DEKKER, L. *et al.* Reconstitution of T Cell Subsets Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. **Cancers**, 12, jul. 2020.

DEKKER, L. *et al.* Naïve T Cells in Graft Versus Host Disease and Graft Versus Leukemia: Innocent or Guilty? **Frontiers in Immunology**, v.13, jun. 2022.

DROZDOV, D. *et al.* Dynamics of recent thymic emigrants in pediatric recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow transplantation**, v. 57, p. 620-626, feb. 2022.

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**, v.10, n. 2, p.174-80, apr. 2012.

GABALLA, A. *et al.* T Cell Receptor Excision Circle (TREC) Monitoring after Allogeneic Stem Cell Transplantation; a Predictive Marker for Complications and Clinical Outcome. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.10, out. 2016.

GREINIX, H. T. *et al.* CD21^{low} B cells and CD4⁺ CD45RA⁺ CD31⁺ T Cells Correlate with First Diagnosis of Chronic Graft- versus-Host Disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.21, p.250-258, set. 2014.

GYURCOKZA, B.; REZVANI, A.; STORB, R. F. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. **Expert Review of Hematology**, v.3, n. 3, p.285-299, jun. 2010.

JANECZKO-CZARNECKA M. *et al.* Thymic activity in immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. **Central European Journal of Immunology**, v.45, n.2, p.151-159, 2020.

HOARE, R. A. *et al.* Predicting CD4 T-Cell Reconstitution Following Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.102, n.2, ago. .2017

HOLLER, E.; GREINIX, H.; ZEISER, R. Acute Graft-Versus-Host Disease. In: E. (Carreras *et al.* (eds.) **The EBMT Handbook**. 2019. p. 323-330.

KALINA, T. *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**. v.26, p. 1986-2010, 1994.

KANAKRY, C. G. *et al.* Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. **JCI Insight**, apr. 2016.

KOHLER, S.; THIEL, A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T -cell subsets. **Blood**, v.113, n.4, jun. 2008.

MORANDO, J. *et al.* Transplante de células-tronco hematopoéticas em crianças e adolescentes com leucemia aguda. Experiência de duas instituições brasileiras. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n. 5, p.350-357, 2010.

NAKAMAE, H. *et al.* A prospective observational study of immune reconstitution following transplantation with post-transplant reduce-dose cyclophosphamide from HLA-haploidentical donors. **Transplant International**, v.32, p.1322-1332, set. 2019.

ROESSEL, I. V. *et al.* Early CD4⁺ T cell reconstitution as Predictor for Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. **ISCT CYTOTHERAPY**, 22, p. 503-510, set. 2020.

TOUBERT, A. *et al.* Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. **Tissue Antigens**, v. 79, p. 83-89, jan. 2012.

VELARDI, E. *et al.* T cell regeneration after immunological injury. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, p. 277-291, mai. 2017.

VELARDI, E. *et al.* The role of the thymus in allogeneic bone marrow transplantation and recovery of the peripheral T-cell compartment. **Seminars in Immunopathology**, 2021.

ZHANG, P.; TEY, SK. Adoptive T Cell Therapy Following Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Frontiers in Immunology**. v.10, A1854, 2019.

WALLER, E. K. *et al.* Kinetics of immune cell reconstitution predict survival in allogeneic bone marrow and G-CSF-mobilized stem cell transplantation. **Blood advances**. v. 3, n. 15, p. 2251-2263, ago. 2019.

Tables:

Table 1: Patient's demographics (n=186).

Characteristics	N (%)
Age at HCT	
<10 years-old	126 (67.7%)
≥10 years-old	60 (32.3%)
Sex	
Male	114 (61.3%)
Female	72 (38.7%)
Diagnosis	
Malignant diseases	76 (40.9%)
Bone marrow failure syndromes	69 (37.1%)

Inborn errors of immunity	34 (18.3%)
Inborn errors of metabolism	7 (3.8%)
Stem cells source	
Bone marrow	171 (91.9%)
Peripheral blood	15 (8.1%)
Donor type	
Unrelated donors	88 (47.3%)
Haploidentical	63 (33.9%)
Related donors	35 (18.8%)
Conditioning regimens	
Myeloablative	102 (54,8%)
Reduced intensity	84 (45.2%)
GvHD prophylaxis	
CSA + MTX	101 (54.3%)
PTCY + CSA + MMF	73 (39.2%)
CSA + other drugs	12 (6.5%)
Use of r-ATG	
Yes	101 (54.3%)
No	85 (45.7%)
Use of TBI	
Yes	93 (50.0%)
>400 cGy	59 (31.7%)
200 – 400 cGy	34 (18.3%)
No	93 (50.0%)
Patient CMV serostatus	
Positive	165 (88.7%)
Negative	21 (11.3%)
Donor CMV serostatus	
Positive	155 (83.3%)
Negative	31 (16.7%)

Legend: Data are described as n (%). ATG-anti-thymocyte globulin, PTCy: post transplantation cyclophosphamide, CMV-Cytomegalovirus, CSA-cyclosporine, MMF-mycophenolate mofetil, MTX=methotrexate, NA: not applicable; HCT-hematopoietic stem cell transplantation blood, TBI- total body irradiation.

Table 2: Lymphocyte subpopulations on D+100 n= (130), D+180 n= (93) and D+360 n= (76).

Subpopulation	D+100 (n=130)	D+180 (n=93)	D+360 (n=76)
WBC/μL	4015 (700 – 18900)	4800 (1090 – 24120)	5760 (2440 – 19630)
Lymphocytes/μL	788 (57,0 – 8001)	1368 (138 – 12630)	1973 (190 – 6922)
T Cell CD3⁺	548 (3.4 – 6864)	985 (68 – 10393)	1402 (173 – 5524)
T Cell CD3⁺CD4⁺	129 (2.3 – 1560)	240 (2.9 – 1743)	419 (90 – 1695)
RTE CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺	4,3 (0.0 – 115)	41 (0.0 – 505)	96 (0.0 – 977)
T Cell CD3⁺CD8⁺⁺	320 (0.6 – 5152)	551 (17 – 9144)	789 (73 – 5164)
RTE CD8⁺CD31⁺CD45RA⁺	61 (0.0 – 3038)	138 (2.0 – 2515)	260 (14 – 1627)
NK Cell CD16⁺CD56⁺	136 (14.3 – 953)	190 (20 – 5877)	202 (16 – 1228)
B Cell CD19⁺	59 (0.0 – 526)	126 (0.0 – 1265)	277 (0.0 – 1273)

Legend: RTE-recent thymic emigrants; NK-*natural-killer*, WBC (White blood cell)

Analyses of lymphocyte subpopulations showed in absolute value/ μ L reported as median (min-max).

Supplementary

TABLE S1: Leukocytes, Lymphocytes (T, B and NK), at D+100 (n=130), D180 (n=93) and D360 (n=76), compared according to age <10 years and ≥10 years.

Variable	D+100			D+180			D+360		
	Age	N	Median (Min- Max)	P	N	Median (Min- Max)	P	N	Median (Min- Max)
Leukocytes/ μ L	<10	92	4360 (700-18900)		64	5340 (2040-24120)		45	5770 (2440-19630)
	≥10	38	3245 (1780-10290)	0.005	29	4240 (1090-8050)	0.011	31	5630 (2940-15100)
Lymphocytes/ μ L	<10	92	886 (57-8001)		64	1567 (139-12631)		45	2060 (190-6922)
	≥10	38	629 (129-3993)	0.019	29	1010 (229-3468)	0.063	31	1686 (715-4163)
Lymphocyte Subpopulations									
CD3⁺T / μ L	<10	92	572 (3.4-6884)		64	1070 (68-10393)		45	1399 (173-5524)
	≥10	38	396 (45.1-3737)	0.029	29	661 (167-2452)	0,174	31	1405 (398.5-2934)
CD3⁺CD4⁺ / μ L	<10	92	162 (2.3-1560)		64	279.3 (50.3-1743)		45	441 (90.3-1695)
	≥10	38	90 (7.9-431)	0.002	29	194.8 (3.0-548.2)	0,076	31	327.6 (172.3-1254)
RTE CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺ / μ L	<10	92	5.3 (0.0-115)		64	53.1 (0.1-505.2)		45	171.6 (1.2-977.6)
	≥10	38	2.2 (0.0-17.5)	0.022	29	22 (0.0-208.1)	0.078	31	60.7 (0.0-815.8)
CD3⁺CD8⁺⁺ / μ L	<10	92	352 (0.6-5152)		64	607.5 (17.4-9144)		45	797.5 (73.4-5164)
	≥10	38	288 (5.1-3366)	0.192	29	413.4 (36.6-1872)	0.236	31	781.2 (138.7-2070)
RTE CD8⁺CD31⁺CD45RA⁺ / μ L	<10	91	72.8 (0.0-3038)		64	153.8 (2.0-2015)		45	240.3 (19.2-1627)
	≥10	38	48 (0.0-2260)	0.049	29	81.2 (2.9-885.6)	0.398	31	260.4 (14.3-724.9)
LymphocytesNK	<10	92	151.4 (14.3-953.5)		64	214.5 (36.5-5087)		45	276.9 (0.8-1273)
	≥10	38	115.4 (19.4-463.8)	0.141	29	144 (20.0-1959)	0.013	31	277 (0-713.8)
LymphocytesB	<10	92	66.2 (0.0-526.4)		64	145.3 (0-1265)		45	224.3 (15.9-1216)
	≥10	38	44.1 (0.0-200.6)	0.069	29	94.5 (0-323)	0.081	31	177 (31.8-1228)

Nonparametric Mann-Whitney test, p<0.05 - Median values, (min-max).

Table: S2 Median values for RTE CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺ lymphocytes/ μ L, on D+100, (n=130); D+180 (n=93); D+360 (n=76).

Covariates	D+100			D+180			D+360		
	N	Median (min-max)	P	N	Median (min-max)	P	N	Median (min-max)	P
Donor type *									
RD	17	7.9 (0.0-69.6)		18	63.1 (4.0-332.6)		16	152.3 (6.5-914.2)	
URD	67	4.4 (0.0-115)		39	23.2 (0.2-472.1)		35	82.5 (0.0-815.8)	
HAPLO	46	2.4 (0.0-32.2)	0.024	36	46.2 (0.0-505.2)	0.352	25	85.4 (1.2-815.8)	0.672
Diagnosis**									
Non-Malignant	81	4.0 (0.0-115)		58	53.1 (0.0-505.2)		53	89.2 (0.0-977.6)	
Malignant	49	5.1 (0.1-75.6)	0.818	35	30 (0.2-286.4)	0.250	23	136.4(1.2-815.8)	0.843
Conditioning**									
Myeloablative (MAC)	70	5.2 (0.0-75.6)		47	26.6 (0.2-472.1)		35	72 (1.2-914.2)	
Reduced intensity (RIC)	60	3.5 (0.0-115)	0.386	46	70 (0.0-505.2)	0.085	41	106 (0.0-977.6)	0.463
Cell Source **									
Bone marrow	118	4.3 (0.0-115)		88	43.6 (0.0-505)		72	96 (0.0-977.6)	
Peripheral blood	12	4.8 (0.1-11.9)	0.621	5	22 (5.8-81.6)	0.423	4	95.2 (5.7-578.8)	0.613
rabbit ATG **									
No	52	6.5 (0.0-115)		46	43.3 (1.4-505.2)		32	127 (1.2-914.2)	
Yes	78	2.4 (0.0-82.9)	0.007	47	29.3 (2.0-472.1)	0.836	44	85.9 (0.0-977.6)	0.825
TBI *									
0 - No	69	4.4 (0.0-82.9)		50	53.2 (0.1-472.1)		40	97.6 (0-977.6)	
2- 200-400 cGy	24	2.4 (0.0-115)		19	20.0 (0-505.2)		16	82.9 (15.8-971)	
1- > 400 cGy	37	5.1 (0.1-38.3)	0.488	24	34.1 (0.2-184.6)	0.288	20	152.9 (1.2-815.8)	0.778
GvHD									
1- CSA + MTX	65	5.3 (0.0-82.9)		48	41.6 (0.2-472.1)		44	97.6 (0.0-914.2)	
2- CSA+ PTCy + MMF	53	2.6 (0.0-115)		38	46.3 (0.0-505.2)		26	137.2 (1.2-977.6)	
prophylaxis*									
3- CSA+/- other drugs	12	10.6 (0.0-74.5)	0.170	7	30 (1.7-149.1)	0.707	6	82.9 (5.7-578.8)	0.799
CMV									
No	50	5.3 (0.0-75.6)		31	5.6 (0.1-472.1)		22	151.1 (1.6-815.8)	
reactivation **									
Yes	80	3.8 (0.0-115)	0.470	62	39.9 (0.0-505.2)	0.738	54	96 (0.0-977.6)	0.140
Acute GvHD **									
No	93	4.4 (0.0-115)		64	56.8 (1.0-505.2)		55	151.2 (0.0-977.6)	

	Yes	37	3.8 (0.0-82.4)	0.301	29	11.7 (0.0-279.6)	<0.001	21	37.8 (2.0-791.9)	0.064
Degree	0	93	4.4 (0.0-115)		64	56.8 (1.0-505.2)		55	151.2 (0.0-977.6)	
Acute GvHD *	I – II	21	5.4 (0.2-82.4)		14	28.1 (0.2-279.6)		9	169.4 (2.4-704.8)	
	III – IV	16	1.9 (0.0-17.5)	0.056	15	6.0 (0.0-65.5)	<0.001**	12	36.9 (2.0-794.9)	0.094
	No	108	4.4 (0.0-115)		77	44.6 (0.0-505.2)		60	161.4 (0.0-977.6)	
Chronic GvHD*	Yes	13	2.6 (0.0-16)		11	7.1 (0.1-152.9)		14	15.9 (1.2-704.8)	
	Competitive risk	9	7.0 (0.0-75.6)	0.166	5	11.1 (1.4-168.4)	0.086	2	38.3 (6.5-70)	-

*Kruskal-Wallis non-parametric test and **Mann-Whitney non-parametric test, p<0.05 mean, median, (min-max) values.

ATG=anti-thymocyte globulin, PTCY: post transplantation cyclophosphamide, CMV-cytomegalovirus, CSA-cyclosporin, GvHD-graft-versus-host disease, HAPLO-haploidentical, HCT=hematopoietic cell transplantation, MMF=mycophenolate mofetil, RD-related donor, UD-unrelated donor, MTX-methotrexate, TBI-total body irradiation

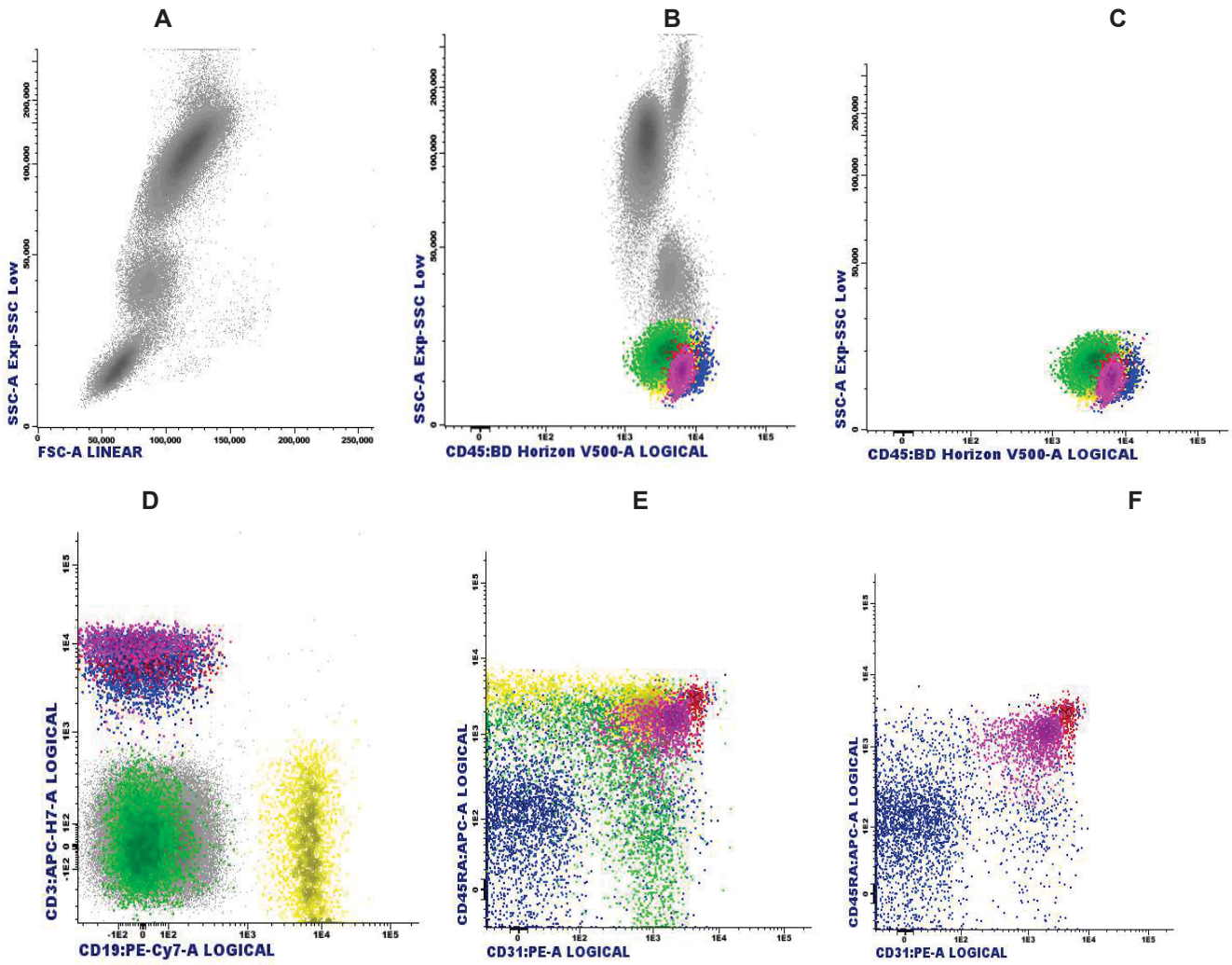


FIGURE 1: Gating strategy for the analysis of cell subsets. (A) Clearing of cell debris SSC low x FSC-A, (B) SSC-A x CD45⁺ Lymphocyte gate, (C) Dot plot - CD19⁺ B-Lymphocytes (yellow) x CD3⁺ T-Lymphocytes (blue, pink and red), (D) Lymphocyte gate CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺ (pink) and CD8⁺CD31⁺CD45RA⁺ (red) (E) Lymphocyte T gate CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺ (pink) and CD8⁺CD31⁺CD45RA⁺ (red), Flow Cytometer -FACSCanto II™ BD Biosciences.

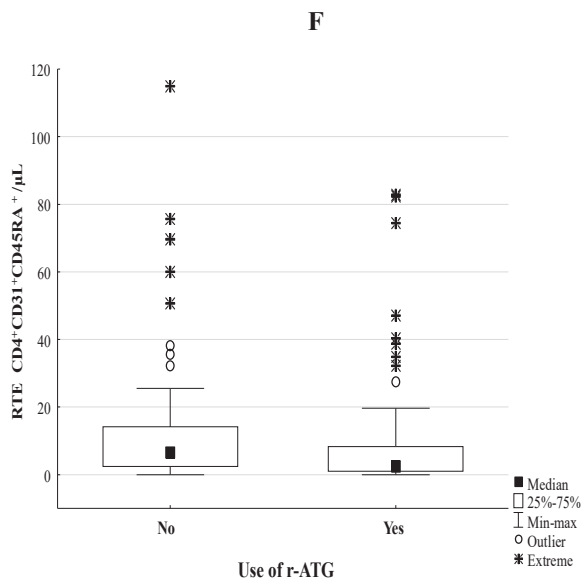
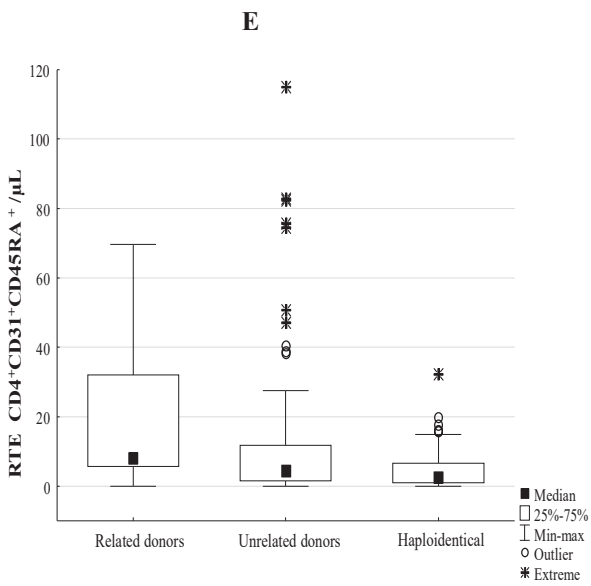
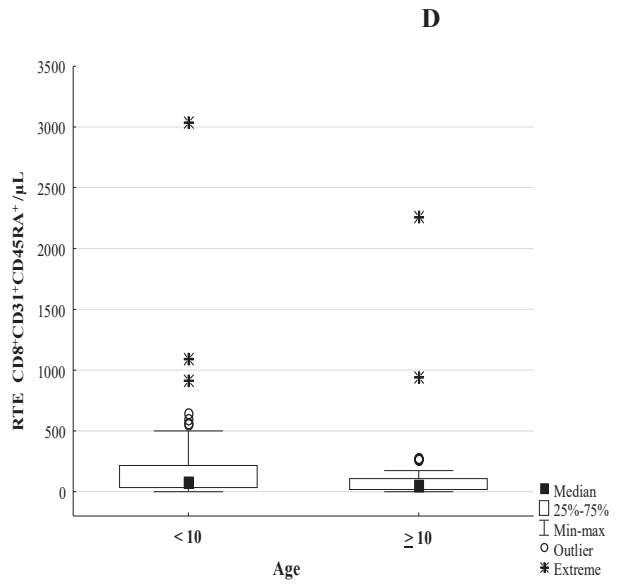
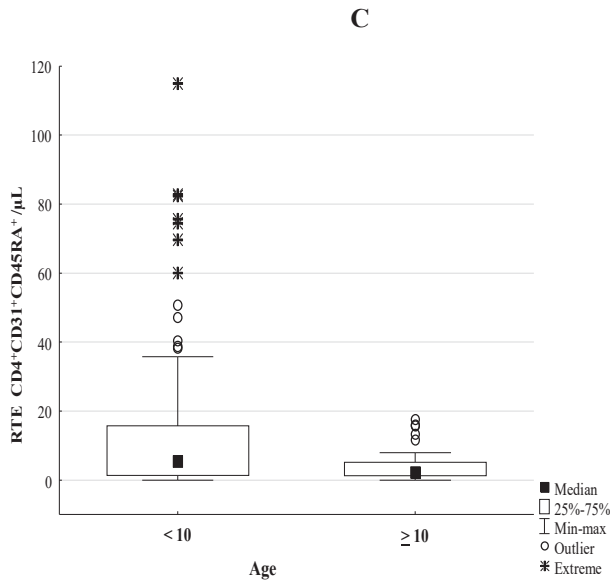
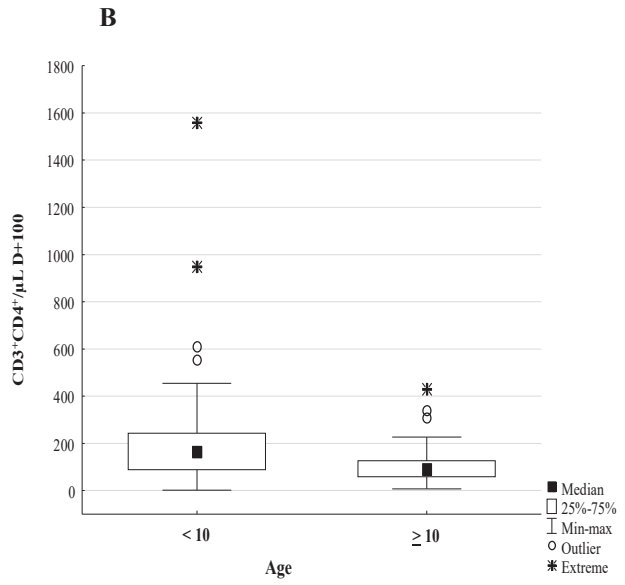
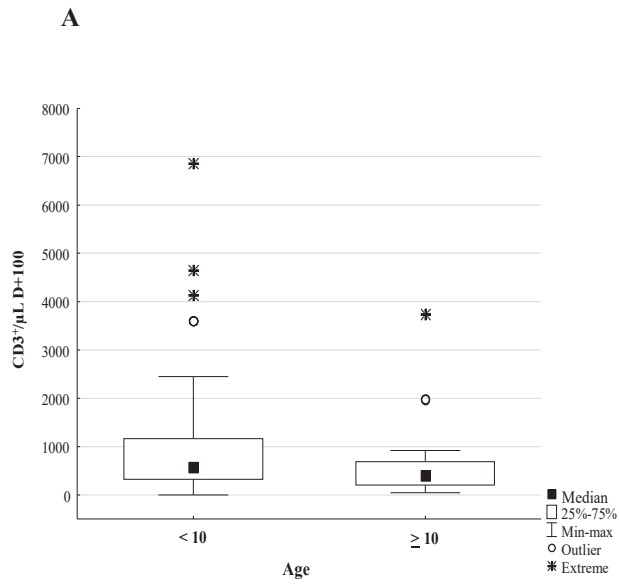


FIGURE 2: D+100 T lymphocytes absolute values (cells/ μ l) comparing between groups younger and older than 10 years [(A) CD3⁺; (B) CD4⁺; (C) RTE CD4⁺ and (D) RTE CD8⁺]; D+100 RTE CD4⁺ absolute values (cells/ μ l) compared between donor types (E) and between use and non-use of r-ATG (F).

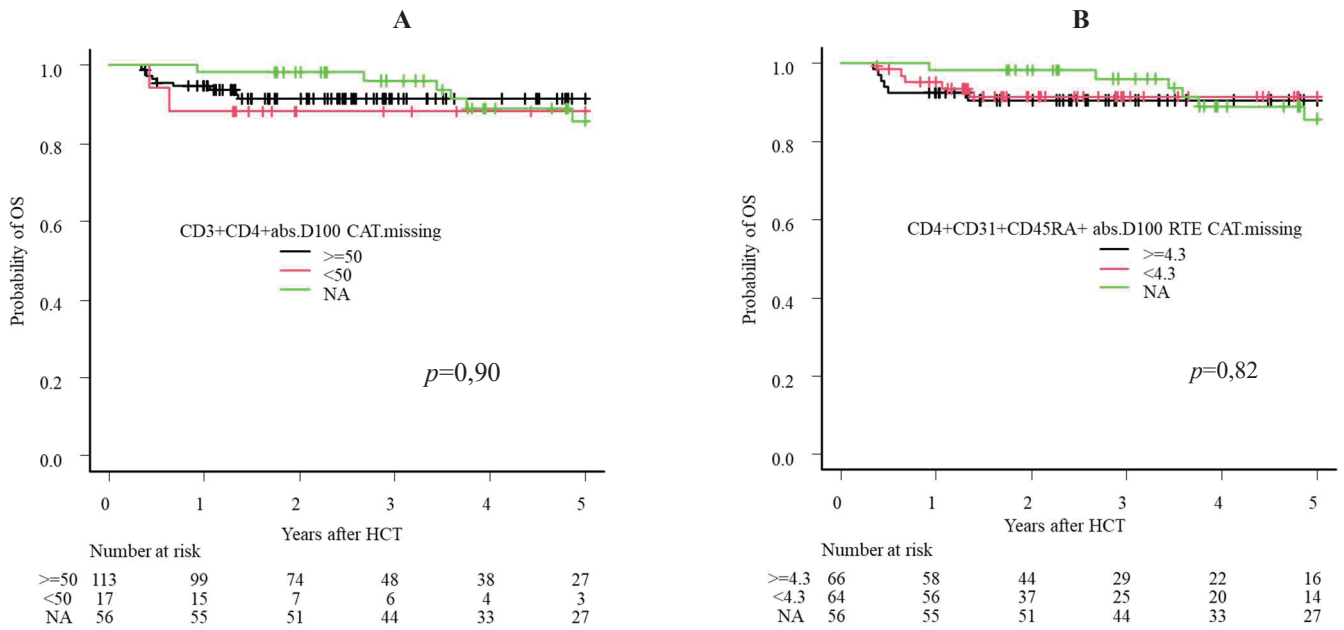


FIGURE 3: Overall survival in relation to CD4⁺ T lymphocytes thresholds at D+100, n= (130), with adjustment for missing data: CD4⁺ T lymphocytes 50/ μ L (A); median RTE T lymphocytes 4.35 μ L (B).

5 CONCLUSÕES

Em resumo, neste estudo, com base na evolução de pacientes avaliados, podemos concluir que:

- No D+100 os valores absolutos dos linfócitos RET CD4⁺CD31⁺CD45RA e CD8⁺CD31⁺CD45RA, foram maiores em crianças menores de 10 anos. A imunossupressão com o uso de ATG, diminuiu a produção tímica dos linfócitos RET CD4⁺, em relação ao grupo de pacientes que não utilizaram ATG.

Os valores obtidos dos linfócitos T CD4⁺ (mediana e o comparativo com o valor sugerido na literatura) e dos linfócitos T RET (mediana) não foram preditores para os desfechos de reativação de CMV, presença de DECH aguda e quanto a sobrevida global.

- No D+180: a produção tímica dos linfócitos T RET CD4⁺ foi afetada pela presença da DECH aguda e grau da DECH. A recuperação numérica dos linfócitos RET CD8⁺, foi maior nos pacientes soropositivos para CMV. A mediana de linfócitos T RET CD4⁺, não foi considerada um preditor para sobrevida global.

Mostramos que a regeneração das funções tímicas e a expansão timo dependente, foram impactadas por fatores como; idade, uso de ATG, presença e grau de DECH aguda. A sobrevida global foi melhor nas crianças menores de 10 anos, pacientes que tinham doadores soropositivos para CMV. As complicações relacionadas a DECH aguda, interferem para uma pior sobrevida global. O monitoramento dos linfócitos T RET, a partir do terceiro mês após transplante, pode ser um parâmetro utilizado, a fim de verificar a reativação da função tímica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, este estudo demonstrou que a produção precoce das células RET em várias doenças pediátricas tratadas com TCTH pode diferir de acordo com a idade do doente, o tipo de dador e a imunossupressão utilizada. Portanto, a comparação da dinâmica da RTE baseada em células T *naive* que expressam CD31 em várias doenças pediátricas tratadas com TCTH, conforme apresentado aqui, acrescenta mais informações à literatura, pois indica uma melhor recuperação da função tímica em crianças com menos de 10 anos. Além disso, esta é uma oportunidade para padronizar painéis e protocolos para a avaliação da reconstituição da RTE no TCTH pediátrico em países com recursos limitados, a fim de analisar melhor o impacto da doença subjacente e da toxicidade do condicionamento, da imunoprofilaxia e da DECHa na função tímica a longo prazo.

O monitoramento detalhado do compartimento dos linfócitos T, fornece um melhor conhecimento para avaliação da RI, capaz de discernir quais células estão associadas a eventos benéficos ou adversos. No entanto, é necessária uma padronização dos marcadores utilizados, ou por diretrizes nacionais ou internacionais, além de um registro em bancos de dados, hábeis em contribuir com o conhecimento de quais efeitos pós transplante, estejam envolvidos no contexto da Recuperação Imunológica.

REFERÊNCIAS

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

ADMIRAAL, R. *et al.* Excellent T-cell reconstitution and survival depend on low ATG exposure after pediatric cord blood transplantation. **Blood**, v.128, dez. 2016.

ARMITAGE, J. O. Bone marrow transplantation - Medical Progress. **The New England Journal of Medicine**, v.330, p. 827-838, 1994.

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

AZEVEDO, J. T. C. **Avaliação da função tímica em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas**. 170f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

BATOROV, E. V. *et al.* CD4⁺ memory T cells retain surface expression of CD31 independently of thymic function in patients with lymphoproliferative disorders following autologous hematopoietic stem-cell transplantation. **Internacional Journal of Hematology**, v.106, mar. 2017.

BD Biosciences. Disponível em: <<https://wwwbdbiosciences.com/en-au/products/reagents/flow-cytometry-reagents/clinical-diagnostics/single-color-antibodies-asr-ivd-ce-ivd/cd19-pe-cy-7.341113>>. Acesso: 16 nov. 2022.

BELTRAME, M. P. **Recuperação Imune em Pacientes com Anemia de Fanconi após Transplante de Medula Óssea Alogênico**. 110 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Departamento de Clínica Médica, do setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BERTANIA, A. *et al.* An ISCT Cell Engineering Committee Position Statement on Immune Reconstitution: the importance of predictable and modifiable milestones of immune reconstitution to transplant outcomes. **ISCT CYTOTHERAPY**, 24, p. 385-392, 2022.

BERGER, M. *et al.* Lymphocyte subsets recovery following allogeneic bone marrow transplantation (BMT): CD4⁺ cell count and transplant-related mortality. **Bone Marrow Transplantation**, p.55-62, out. 2007.

BERTHO, A; L. FERRAZ. Citometria de Fluxo: princípios metodológicos de funcionamento. In: DUARTE, A. J. S.; SALES, M. M.; VASCONCELOS, D. M. **Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e Pesquisa**. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte: Atheneu. 2013. p. 3-17.

BOELENS, J. J.; HOSSZU, K. K.; NIERKENS, S. Immune Monitoring After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Toward Practical Guidelines and Standardization. **Frontiers in Pediatrics**, v.8, n. 454, ago. 2020.

BOFFO, M. S. **Transplante Alogênico de Células-Tronco Hematopoiéticas no Grupo Infante/Juvenil no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS: Uma Análise de suas Características, Complicações e Desfechos**. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

BOUZAS, L. F. *et al.* Diretrizes para o diagnóstico, classificação, profilaxia e tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica. **Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.32, Supl.1, p. 22-39, 2010.

CARDOSO, C. C.; SANTOS-SILVA, M. C. Eight-color panel for immune phenotype monitoring by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, 468; p. 40-48, mar. 2019.

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação e Tecnologias no SUS, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Imunossupressão pós transplante de Medula Óssea. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2016/imunossupressao_transplantemedulaossea_cp45_2016.pdf>. Acesso: 11 set. 2022.

DEKKER, L. *et al.* Reconstitution of T Cell Subsets Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. **Cancers**, 12, jul. 2020.

DEKKER, L. *et al.* Naïve T Cells in Graft Versus Host Disease and Graft Versus Leukemia: Innocent or Guilty? **Frontiers in Immunology**, v.13, jun. 2022.

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

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**, v.10, n. 2, p.174-80, apr. 2012.

FONSECA, R. B.; SECOLI, S. R. Terapia farmacológica em Transplante de Medula Óssea: Contribuição para Prática da Enfermagem. **Rev. Bras. Oncologia Clínica**, 2 v.3, n. 8, p.13-18, mai/ago. 2006.

GABALLA, A. *et al.* T Cell Receptor Excision Circle (TREC) Monitoring after Allogeneic Stem Cell Transplantation; a Predictive Marker for Complications and Clinical Outcome. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.10, out. 2016.

GLOWALA-KOSINSKA, M. *et al.* Thymic Activity and T Cell Repertoire Recovery after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation Preceded by Myeloablative Radiotherapy or Chemotherapy. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.22, p.834-842, jan. 2016. Elsevier BV.

GREINIX, H. T. *et al.* CD21^{low} B cells and CD4⁺ CD45RA⁺ CD31⁺ T Cells Correlate with First Diagnosis of Chronic Graft- versus-Host Disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.21, p.250-258, set. 2014. Elsevier BV.

GEDDES, M.; STOREK, J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v.20, n.2, p.329-348, 2007. Elsevier BV.

GIRDLESTONE, J. *et al.* Immune reconstitution following umbilical cord blood transplantation: IRES, a study of UK paediatric patients. **eJHaem British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd**, 1, p.218-218, 2020.

GYURCOKZA, B.; REZVANI, A.; STORB, R. F. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. **Expert Review of Hematology**, v.3, n. 3, p.285-299, jun. 2010.

JANAWAY JR, C. A. *et al.* **Imunologia. O Sistema imune na saúde e na doença.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2007.

JUNGE, S. *et al.* Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺ (PECAM-1) CD4⁺T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. **European Journal of Immunology**, v.37, p.3270-3280, set. 2007.

KOHLER, S.; THIEL, A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subtypes. **Blood**, v.113, n.4, jun. 2008.

KOLINS, J. A. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v.23, p.349-376, fev.2011. Elsevier BV

HOARE, R. A. *et al.* Predicting CD4 T-Cell Reconstitution Following Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.102, n.2, ago. 2017

HOLMBERG-THYDEN, S. *et al.* A user' s guide to multicolor flow cytometry panels for comprehensive immune profiling. **Analytical Biochemistry**, 627, 2021.

LACERDA, J. F. Reconstituição Imunológica após Transplante Alogênico de Células Estaminais. **Acta Médica Portuguesa**, v.17: p.471-480, 2004.

LIGEIRO, D. J. P. **Reconstituição Hemato-imunológica após o transplante de células estaminais hematopoiéticas: recuperação da policlonalidade dos linfócitos T e B e da funcionalidade das células NK.** 266 f. Tese (Doutorado em Ciências da Vida na Especialidade em Imunologia na Faculdade de Ciências Médicas) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

MENEZES, A. R. P. **Transplante de Medula Óssea: Importância do Sistema HLA.** 13f. (Curso de Pós-Graduação Lato-Sensu em Hematologia Prática e Essencial) - Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer-INCA. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/pesquisa/plataformas-multiusuario/citometria>>. Acesso em 16 nov. 2022.

MORANDO, J. *et al.* Transplante de células-tronco hematopoéticas em crianças e adolescentes com leucemia aguda. Experiência de duas instituições brasileiras. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n. 5, p.350-357, 2010.

NAKAMAE, H. *et al.* A prospective observational study of immune reconstitution following transplantation with post-transplant reduce-dose cyclophosphamide from HLA-haploidentical donors. **Transplant International**, v.32, p.1322-1332, set. 2019.

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

Registro Brasileiro de doadores voluntários de Medula Óssea (REDOME). Instituto Nacional do Câncer. Brasil. Disponível em: <<https://redome.inca.gov.br/institucional/dados/>>. Acesso: 08 set. 2022.

REIS, M. A. L.; VISENTAINER, J. E. L. Reconstituição imunológica após o transplante de medula óssea alogênico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.26, n. 3, p.212-217, 2004.

SOARES, D. S. *et al.* Doença do Enxerto Contra Hospedeiro: Relato de caso. **Série: Ciências da Saúde**, v.8, n. 1, p.91-113, 2007.

VELARDI, E. *et al.* The role of the thymus in allogeneic bone marrow transplantation and recovery of the peripheral T-cell compartment. **Seminars in Immunopathology**, 2021.

VOLTARELLI, J. C.; STRACIERI, A. B. P. L. Aspectos Imunológicos dos Transplantes de Células-Tronco Hematopoéticas. **Simpósio: Transplante de Medula Óssea, Medicina de Ribeirão Preto**, v.33, p.443-462, out/dez. 2000.

PASQUINI, R.; COUTINHO E.; Fundamentos do Transplante de Células Hematopoéticas, In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 75, p. 711-729.

PARK, M. SEO, J. J. Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Bone Marrow Research**, v. 2012, 7 p. 2012.

ROESSEL, I. V. *et al.* Early CD4⁺ T cell reconstitution as Predictor for Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. **ISCT CYTOTHERAPY**, 22, p. 503-510, set. 2020.

SILVA, B. C. M.; VASCONCELOS, D. M.; SALES, M. M. Citometria de Fluxo: Aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. **In: DUARTE, A. J. S.; SALES, M. M.; VASCONCELOS, D. M. Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e Pesquisa**. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte: Atheneu. 2013. p. 25-27.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. São Paulo: Atheneu, 1996.

WANG, L. D.; WAGERS, A. J. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 12 (10), p. 643-655, jun. 2014.

WANG, XY. The Quantification of Minimal Residual Disease Pre-and Post-Unmanipulated Haploidentical Allograft by Multiparameter Flow Cytometer in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Cytometry**. Cytometry Part B, 2019.

WALLER, E. K. *et al.* Kinetics of immune cell reconstitution predict survival in allogeneic bone marrow and G-CSF-mobilized stem cell transplantation. **Blood advances**. v. 3, n. 15, p. 2251-2263, ago. 2019.

ZHANG, P.; TEY, SK. Adoptive T Cell Therapy Following Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Frontiers in Immunology**. v.10, A1854, 2019.

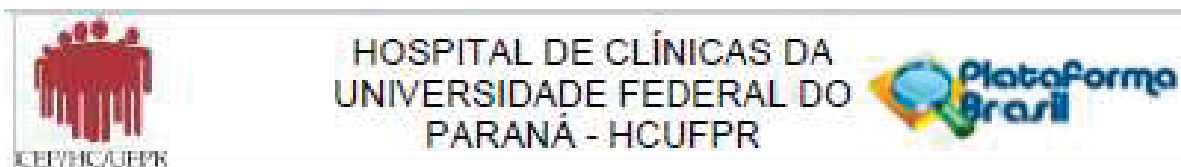
APÊNDICE

APÊNDICE 1 – ESTADIAMENTO E GRADUAÇÃO DA DECH AGUDA POR ORGÃO

DECH aguda		PELE	FÍGADO	Trato gastrointestinal
ESTÁGIO	+	Exantema maculopapular em <25% da superfície corporal	Bilirrubina:2-3 mg/dL	Diarreia (500-1000mL) persistente e náuseas; crianças 10-19,9 mL/Kg/dia
	++	Exantema maculopapular em 25-50% da superfície corporal	Bilirrubina:3-6 mg/dL	Diarreia (1000-1500mL) persistente; crianças 20-30 mL/Kg/dia
	+++	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina:6-15 mg/dL	Diarreia >1500mL; crianças >30 mL/Kg/dia
	++++	Descamação e bolhas	Bilirrubina: >15 mg/dL	Dor com ou sem obstrução
GRADUAÇÃO	(nenhum)	0	0	0
	I (leve)	+ a ++	0	0
	II (moderado)	+ a +++	+	+
	III (grave)	++ a +++	++ a +++	++ a +++

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER SUBSTANCIADO DO CEP (continua)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do monitoramento dos linfócitos T recém emigrados do timo (CD31+45RA+) após transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH)

Pesquisador: Carmem Maria Sales Bonfim

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 21249219.6.0000.0096

Instituição Proponente: MATERNIDADE VICTOR FERREIRA DO AMARAL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 11/11/2022

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.805.957

Apresentação da Notificação:

Trata-se de um relatório parcial onde a pesquisadora relata ter finalizado a coleta de dados, com 193 participantes ou coleta de dados incluídos no estudo, sendo 2 retirados/descontinuados. Sem relatos de intercorrências.

Resumo de trabalho submetido ao XXVI Congresso SBTMO 2022, publicado no Journal of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (JBMTCT). Vol. 3 No. Suppl1 (2022)

Objetivo da Notificação:

Apresentar relatório parcial

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem relatos de alterações em relação ao projeto anteriormente aprovado

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR



Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br

ANEXO 1 – PARECER SUBSTANCIADO DO CEP (continuação)

 CEI/HC/UFPR	HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - HCUFPR	
--	--	---

Continuação do Parecer: 5.605.667

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Notificação adequada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos presentes

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Notificação aprovada

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Notificação. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Anexo_Resumo_JBMTCT.pdf	11/11/2022 15:24:49	Júlia Lillian Pimentel Justus	Postado
Envio de Relatório Parcial	RELATORIO_PARCIAL_PESQUISA.pdf	11/11/2022 15:25:05	Júlia Lillian Pimentel Justus	Postado
Envio de Relatório Parcial	modelo_relatorio_padrao_cep_hc.doc	11/11/2022 15:25:28	Júlia Lillian Pimentel Justus	Postado

Situação do Parecer:

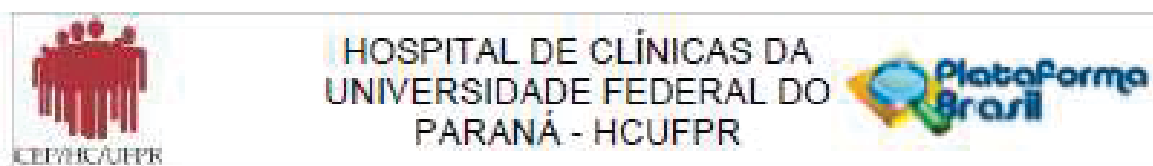
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181		CEP: 80.060-900
Bairro: Alto da Glória		
UF: PR	Município: CURITIBA	
Telefone: (41)3360-1041	Fax: (41)3360-1041	E-mail: cep@hc.ufpr.br

ANEXO 1 – PARECER SUBSTANCIADO DO CEP (conclusão)



Continuação do Parecer: 5.505.007

CURITIBA, 09 de Dezembro de 2022

Assinado por:
Nilazy Ramos Filho
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

MONITORING OF RECENT THYMIC EMIGRATED T-LYMPHOCYTES (CD31+45RA+) AFTER HEMATOPOETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Julie Lillian Fimentel Justus¹, Miriam P. Beltrame¹, Ana Paula de Azambuja¹, Douglas Câmara de Oliveira², Carmem Bonfim³.

1. CHC - Hospital De Clínicas, Curitiba - PR - Brazil; 2. Hospital Erasmo Gaertner E UFPR (Universidade Federal Do Paraná), Curitiba - PR - Brazil; 3. Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba - PR - Brazil; 4. Hospital Infantil Pequeno Príncipe e PPGSA UFPR, Curitiba - PR - Brazil.

Hematopoietic stem cell transplantation; Recent emigrated T lymphocytes from thymus; Immune-recovery.

INTRODUCTION: Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is potentially a curative treatment for several hematologic diseases. Post-transplant functional immune recovery may be associated with control of relapse, viral reactivations, graft-versus-host disease (GVHD) and improved survival.

OBJECTIVE: To evaluate total lymphocytes, recent thymic emigrant (RTE), and B and NK lymphocytes at D+100 in three types of grafts.

MATERIALS AND METHODS: 132 children (80M/52F), with a median age of years (0.8-17.8), 69.7% under 10 years, from two Transplant Centers from 2013 to 2020 were included. The diseases were: malignant diseases (n=49), medullary failures (n=50), primary immunodeficiencies (n=28) and inborn errors of metabolism (n=5). Type of graft, 47 patients received haploidentical transplantation (HAPLO), 17 related (MRD) and 68 unrelated (MUD). Conditioning was myeloablative in 53% and nonmyeloablative in 47%. Bone marrow 90.9% and peripheral stem cell 9.1%. Corticosteroids and methotrexate were used for GVHD prophylaxis in 65 (49.2%), cyclosporine, mycophenolate with post cyclophosphamide in 55 patients (41.6%) and corticosteroids and other drugs in 9 (9.2%). 12 patients died; one patient relapsed, one had primary failure, the others died of other causes, median overall survival was 173 days (122 - 488 days). To analyze the lymphocyte subpopulations by multiparametric flow cytometry (MFC) the markers CD3, CD4, CD8 (T lymphocytes)

CD16/CD56 (NK lymphocytes), CD19 (B lymphocytes), CD31+/CD45RA+ (RTE T lymphocytes) were used, performed on D+100 posttransplant. The absolute counts of lymphocyte and T RTE lymphocytes were compared between HAPLO, MRD and MUD grafts using the non-parametricKruskal-Wallis test and Dunn's test for post-hoc multiple comparisons. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics v.28.0 software.

RESULTS: Lymphocyte recovery at D+100 in the MRD vs MUD vs HAPLO groups was as follows, CD3+CD4+ (115vs129vs141/uL p=0.994); CD3+CD8+ (247vs353vs363/uL p=0.486); CD19+ lymphocytes (64vs64vs45/uL p=0.82), and CD16+/CD56+ NK lymphocytes (132vs122vs165/uL, p=0.289), between HAPLO vs MRD vs MUD, respectively. RTE CD4+ T lymphocytes were lower in HAPLO transplantation (2.6/uL), than in MRD (7.9/uL), MUD (4.4/uL). In the comparison between MRD vs HAPLO types of BMT there was a difference for RTE T lymphocytes p=0.031 and in the analysis of GVHD prophylaxis p= <0.001.

CONCLUSION: Retrospective analysis showed no significant difference in global immunological recovery between the three types of transplantation. The recovery of RTE CD4+ T lymphocytes in the group that received HAPLO BMT was slightly lower than the MRD group, but the presence of RTE lymphocytes may indicate thymic effectiveness. Prospective studies with larger numbers of patients are needed to confirm this finding.

Keywords: Hematopoietic stem cell transplantation. Immune recovery. Recent emigrated T lymphocytes from thymus. T lymphocytes.

ANEXO 2 – RESUMO SUBMETIDO AO CONGRESSO SBTMO 2022 (conclusão)

TABLE I.

Variável	(coluna da planilha)	TMO			p [*]
		AP (n=17)	HAP (n=68)	Haplo (n=47)	
		Mediana (mín-max)	Mediana (mín-max)	Mediana (mín-max)	
WBC_d100	LEUC	3700 (2050 - 7530)	4100 (700 - 10900)	4600 (1690 - 14680)	0,020
Lymph_d100	Linf abs	327 (129 - 1805)	744 (113 - 5175)	305 (57 - 8001)	0,602
LT_d100	CD3 abs	522 (76,4 - 1301)	542 (95,1 - 4651)	394 (3,4 - 6664)	0,753
CD4_d100	CD3+CD4+ abs	115,5 (7,9 - 607)	129 (19 - 551)	141 (2,3 - 1560)	0,994
CD8_d100	CD3+CD8+ abs	247 (59,4 - 1308)	353 (7,8 - 4234)	383 (5,6 - 5157)	0,486
LB_d100	CD19+ abs	64,7 (8,3 - 364)	63,9 (0 - 351)	45,7 (0 - 326)	0,620
LNK_d100	CD16+56+ abs	132,8 (21,3 - 466)	122 (19,4 - 627)	161 (14,3 - 953)	0,389
RET_CD4_d100	CD4+CD31+CD45RA+(RET) abs	7,9 (0 - 694)	4,4 (0 - 115)	2,6 (0 - 32,2)	0,031
RET_CD8_d100	CD8+CD31+CD45RA+(RET) abs	31,1 (1,2 - 294)	63,9 (0 - 3038)	58,9 (0 - 2360)	0,819

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05.

IMMUNE RECOVERY AND THE ROLE OF CD4 AND CD8 RECENT EMIGRATED T LYMPHOCYTES IN PEDIATRIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Julie Lillian Pimentel Justus¹; Ana Paula de Azambuja²; Yara Carolina Schlug¹; Karyna Leal Antonio¹; Miriam P. Beltrame²; Carmem Bonfim¹

¹Hospital de Clínicas Da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR - Brasil;

²Hospital Erasmo Goettner, Curitiba - PR - Brasil.

Introduction: Adequate reestablishment of thymopoiesis is critical for long-term immune reconstitution after transplantation, possibly impacting survival rates. Multiparametric flow cytometry (MFC) can identify and quantify T-cell subpopulations, allowing a better understanding of each patient's immune status.

Objective: Evaluate the reactivation of thymic function through recent thymic emigrants (RTE) analysis after hematopoietic cell transplantation (HCT). **Casusistic:** We included 186 children (114M/72F) transplanted in two HCT centers between 2013 and 2020, median age 7.8y (0.2-17.8), 67.7% under 10 years. Majority had nonmalignant diseases (59.1%), received transplants from alternative donors (81.2%) and bone marrow as stem cell source (91.2%). 102(54.8%) patients received myeloablative and 84 reduced intensity conditioning transplants. GvHD prophylaxis was CSA+MTX (54%) and PTCy+CSA+MMF (37%). 101 patients received ATG and 93 received TBI (>400 rads, n=59; and 200-400 rads, n=34). 52 patients developed acute-GvHD (a-GvHD) median of 30 days after HCT (13-214), being 30 grade I-II and 22 grade III-IV. Median time for neutrophil and platelet engraftment were 19 and 22 days, respectively. Median follow-up after HCT was 1236 (140-3316) days.

Methods: CD3 T-cell and subsets were done at three time-points: D+100 (n=130), D+180 (n=93) and D+360 (n=76). Recent thymic emigrants were defined by co-expression of CD4+CD31+CD45RA+ or CD8+C-

D31+CD45RA+ in MFC. IBM SPSS Statistics v.28.0 and EZR v.1.53 were used for statistical analysis.

Results: D+100: patients <10y had higher RTE CD4 counts (5.3/ μ L range 0-115) vs >10y (2.2/ μ L, range 0-17.5), p=0.022. Median recovery of RTE CD4 was higher in MRD 7.9 cell/ μ L (0-69.6) compared to MUD 4.4 cell/ μ L (0-115) or haploidentical donors 2.4 cell/ μ L (0-32.2), p=0.024, and higher in patients not using ATG (6.5/ μ L vs 2.4/ μ L) p=0.007. At analysis of RTE CD8 only patients <10y had significance (72.8/ μ L vs 48/ μ L, p=0.049). D+180: presence and degree of aGvHD significantly influenced RTE CD4 recovery (p<0.001 for both). Higher degree aGvHD had lower RTE CD4; grade III-IV (median 6.0/ μ L, 0-65.5) vs grade I-II (28.1/ μ L, 0.2-279.6) and patients without GvHD, median 56.8/ μ L (1.0-505.2). Patients with CMV reactivation had a higher RTE CD8 (median 204.6/ μ L, 2.9-2514) vs no reactivation (100.2/ μ L, 2.0-885.6), p=0.022. D+360 no variable was significant in relation to RTE recovery. **Survival:** Overall survival 87.7% at 5-year follow-up, median 1170 days (122 to 3316 days). Age <10y (p=0.045), CMV donor serology (p=0.0145) and aGvHD (p=0.0026) negatively impact survival in multivariate analysis. Other pre-transplant and immunological variables do not show difference in survival.

Conclusion: Thymic regeneration pattern was influenced by patient age, haploidentical HCT, use of ATG and presence of acute GVHD. Flow cytometry RTE CD4+CD31+CD45RA+ monitoring from the third month after HSCT may be used to verify recovery of thymic function.

ANEXO 3 – RESUMO SUBMETIDO AO CONGRESSO SBTMO 2023 (continuação)

FIGURE 1: Reconstitution of RTE T lymphocytes after HSCT, absolute values (cells/ μ l) CD4+CD31+CD45RA+ (A) CD8+CD31+CD45RA+ (B). The edges of the boxes indicate the 25th and 75th percentiles, the lines within the boxes indicate the median, and the error bars extend from the smallest to the largest value.

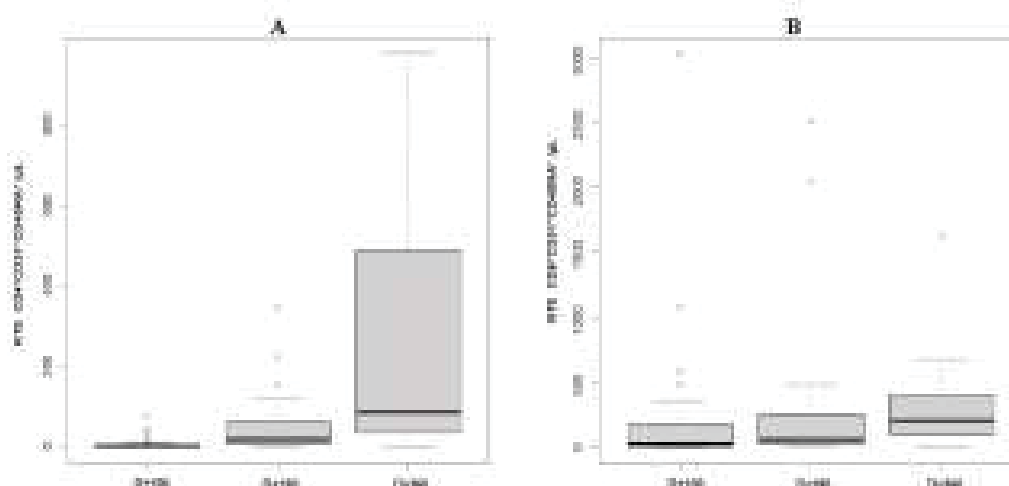


TABLE 1: Patients characteristics (n=186)

Patients	N (%)	Survival-rate (1 year)	p-value
Hospital			
Hospital 1	102 (54.8%)	0.960 (0.898-0.985)	0.769
Hospital 2	84 (45.2%)	0.940 (0.863-0.975)	
Age at HSCT			
<10 year	126 (67.7%)	0.976 (0.927-0.992)	0.045
≥ 10 years	60 (32.3%)	0.900 (0.791-0.954)	
Sex			
Male	114 (61.3%)	0.965 (0.908-0.987)	0.895
Female	72 (38.7%)	0.981 (0.841-0.970)	
Diagnosis			
Malignancy	76 (40.9%)	0.921 (0.833-0.964)	0.605
Bone marrow failure syndromes	69 (37.1%)	0.971 (0.841-0.970)	
Primary Immune deficiency	34 (18.3%)	0.969 (0.798-0.995)	
Inborn errors of metabolism	7 (3.8%)	NA (NA - NA)	
Stem cells source			
BM	171 (91.9%)	0.959 (0.915-0.989)	0.358
FB	15 (8.1%)	0.867 (0.564-0.965)	
Donor type			
MUD	88 (47.3%)	0.982 (0.885-0.989)	0.083
Haploidentical	68 (33.9%)	0.967 (0.876-0.992)	
MUD	35 (18.8%)	0.971 (0.814-0.995)	
Conditioning regimens			
Myeloablative (MAC)	102 (54.8%)	0.964 (0.893-0.988)	0.931
Nonmyeloablative (RC)	84 (45.2%)	0.941 (0.873-0.973)	

ANEXO 3 – RESUMO SUBMETIDO AO CONGRESSO SBTMO 2023 (conclusão)

Prophylaxis of GVHD CSA + MTX CSA + PTCy + MMF CSA + other drugs	101 (54.3%) 69 (37.1%) 16 (8.6%)	0.941 (0.873-0.973) 0.956 (0.869-0.986) 1.000 (NA - NA)	0.154
Use of ATG Yes No	101 (54.3%) 85 (45.7%)	0.950 (0.884-0.979) 0.953 (0.879-0.982)	0.729
Use of TBI Yes <400 rads 200 – 400 rads No	93 (50.0%) 59 (31.7%) 34 (18.3%) 93 (50.0%)	0.908 (0.776-0.953) 0.971 (0.809-0.996) 0.978 (0.915-0.994)	0.152
CMV patient's serostatus Positive Negative	165 (88.7%) 21 (11.3%)	0.945 (0.897-0.971) 1.000 (NA - NA)	0.136
CMV donor serostatus Positive Negative	155 (83.3%) 31 (16.7%)	0.974 (0.933-0.990) 0.833 (0.644-0.927)	0.0145

ATG, antithymocyte globulin; BM, bone marrow; PTCy, cyclophosphamide; CMV, Cytomegalovirus; CSA, cyclosporine; MMF, mycophenolate mofetil; MUD, allogeneic hematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donor; MUD, allogeneic hematopoietic cell transplantation from HLA-matched unrelated donor; MTX, methotrexate; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; PB, peripheral blood; TBI, total body irradiation.

TABLE 2: Multivariate statistical analyses Cox Regression Overall Survival em relation to RTE CD4+ recovery (n=186).

Covariates	Hazard Ratio	p
Acute GVHD: Time-dependent covariate	4.49 (1.69-11.9)	0.0025
Donor Serology (Ref. positive)	4.89 (1.73-13.9)	0.0029
Age 10 years (Ref. <10 years)	2.69 (1.06-6.8)	0.038
CD4+ T - D+100 >50 cells/ μ L	1.62 (0.34-7.58)	0.54
CD4+ T - D+100 median 129 cells/ μ L	2.04 (0.51-8.11)	0.31
CD4+CD31+CD45RA+ T RTE - D+100 median <4.3/ μ L	0.77 (0.23-2.54)	0.67
CD4+CD31+CD45RA+ T RTE - D+180 median <41/ μ L	2.47 (0.26-23.3)	0.43

GVHD, Graft-versus-Host Disease; Ref, reference; RTE, recent thymus emigrated.