UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

JÚLIA TEIXEIRA COTTAS DE AZEVEDO

**Perfis imunológico e hematológico de pacientes com doença falciforme
tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas**

JÚLIA TEIXEIRA COTTAS DE AZEVEDO

**Perfis imunológico e hematológico de pacientes com doença falciforme
tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada
Orientador: Profa. Dra. Kelen C. R. Malmegrim de Farias
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

de Azevedo, Júlia Teixeira Cottas

Perfis imunológico e hematológico de pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto, 2018.

215 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: de Farias, Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim

Co-orientador: Donadi, Eduardo Antonio

1. Doença falciforme. 2. Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. 3. Reconstituição hematológica. 4. Reconstituição imunológica. 5. Doença do enxerto contra o hospedeiro. 6. Falha da enxertia

Esta tese recebeu o apoio financeiro da Capes e da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP), processo nº 2014/00088-8

Folha de aprovação

Nome: de Azevedo, Júlia Teixeira Cottas

Título: Perfis imunológico e hematológico de pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Kelen C. R. Malmegrim de Farias

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À dona do meu maior e mais belo sentimento. Ao meu apoio, meu exemplo de amor, bondade e perdão. A você, minha amada irmã Gabriela.

Agradecimentos

Agradeço aos meus queridos pais, Cássio e Maria, por acreditarem em mim mais do que eu mesma e por me apoiarem em todos os momentos da minha vida. À minha irmã Gabriela, que com seu coração enorme me acolhe, me dá forças e guia meus passos, possibilitando que eu realizasse essa importante etapa da minha vida. Ao meu cunhado Rodolfo, meu grande incentivador. A todos meus familiares que sempre me apoiaram incondicionalmente, especialmente à minha tia Luciana por sempre estar pronta para me ajudar e me proteger e à minha prima Juliana por me acolher com tanto amor e ser a maior fã do nome do meu trabalho. À querida Maria Lúcia que me escolheu como família.

Ao Matheus por encher meus dias de alegria, por ser minha paz, minha calma, meu equilíbrio.

Aos meus amigos de longas datas Anna Carolina, Talita (Tita) e Marcel que mesmo longe viveram cada dia desse longo caminho. Aos queridos Rafael (Mestre), Jhimmy, Sabrina, Maria Izabel pela amizade. À minha doce Laka (Laura) pela lealdade e cumplicidade. Ao meu irmão de alma, Diógenes, que tornou minha vida melhor desde que entrou nela.

Aos meus antigos companheiros de laboratório Kalil, Gislane, Juliana (Ueda) e Carolina, a quem devo parte da minha formação e parte dessa vitória. Aos meus companheiros de laboratório Rafael, Robson, Ângelo, Aline, Marcela, Letícia, João, Ana Júlia, Marianna, Rafaela e Nádia por tornarem esse longo trabalho mais leve. Em especial à Keli, por ajudar nos experimentos, à Amanda pelos conselhos sempre assertivos e ao Mário por anos de companheirismo.

Aos pacientes e aos indivíduos sadios, os quais foram imprescindíveis para a realização desse projeto.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias que me acompanha há quase 10 anos nesse caminho. Você é meu exemplo de dedicação, bondade e simplicidade. Obrigada pelo apoio, atenção, preocupação, compreensão e ensinamentos. Mais do que como profissional, você me formou como pessoa.

À professora Dra. Belinda Simões, meu exemplo de força e garra. Sua dedicação com os pacientes e sua busca incessante pela melhor forma de tratamento para eles me motivaram a realizar

este trabalho. Você me mostrou que estudar a doença falciforme em um país tão desigual como o Brasil vale a pena.

Ao Prof. Dr. Eduardo Donadi, à Thalita Costa e à Ana Carolina Paixão pela ajuda e colaboração.

À Patrícia, à Camila e à Nathália do Laboratório de Citometria de Fluxo que foram essenciais para a realização desse trabalho.

À Rosinha, à Josi e ao Ícaro do Laboratório do Imuno-hemato pela colaboração.

À Dra. Simone Kashima Haddad pelo espaço cedido e a todos os funcionários e colegas do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Eva, sempre tão doce e atenciosa.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior pelo espaço cedido e a todos os funcionários do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, sobretudo à Adriana Marques que foi muito importante para a realização desse trabalho.

À equipe de enfermagem da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pelo auxílio nas coletas de sangue dos indivíduos sadios.

Aos funcionários da limpeza e da copa da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto por sempre nos acolher muito bem, principalmente aos finais de semana.

À Marjory e à Carmen pela disposição e compreensão. À Dalvinha pelo apoio e pelos conselhos.

À diretoria científica e administrativa da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

À professora Vânia pelo exemplo de dedicação ao ensino e pelas melhores aulas de graduação que já assisti.

À Ana, secretária da pós-graduação, pela paciência e dedicação.

Ao Dr. Leigh Keen e aos colegas de Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética (NHS, Bristol), em especial à Jane Thompson, ao Tom Browne, ao Grant Davis e à Kate Giddings.

Às minhas queridas amigas Elaine, Simone, Elo, Marcella, Ju Vinuto e Ana pelo encontro maravilhoso. Vocês foram o presente que a vida me guardou.

Ao professor Dr. Oliver Hermine por ter permitido que meu estágio no exterior fosse realizado. Ao Dr. Thiago Trovati por sua paciência, dedicação e ensinamentos. Aos meus companheiros do Laboratório de Mecanismos Molecular de Desordens Hematológicas e Implicações Terapêuticas (Institut Imagine, Paris), em especial à Guillemette por cuidar de mim e por me fazer sentir tão querida e à Camila por me acolher e me ajudar em todas as dificuldades de se estar fora do seu país de origem.

À Capes e à FAPESP (processo nº 2014/00088-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

Resumo

de Azevedo, Júlia Teixeira Cottas. **Perfis imunológico e hematológico de pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas**. 2018. 215f. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A doença falciforme (DF) é uma doença monogênica, uma das mais prevalentes no mundo, causada por uma mutação pontual na posição 6 do gene codificador da cadeia da β -globina que resulta na produção da hemoglobina anormal S. Atualmente, a única forma de tratamento capaz de curar pacientes com DF é o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCHT) alogênico. Porém, poucos trabalhos da literatura avaliaram os mecanismos de ação envolvidos nas diferentes respostas terapêuticas dos pacientes com DF ao TCHT alogênico. Além disso, embora o sistema imunológico tenha um papel central no TCHT, nenhum estudo correlacionou o padrão de reconstituição imunológica com o desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e com a permanência do enxerto nos pacientes transplantados. Assim, nesse trabalho, avaliamos os mecanismos de reconstituição hematológica e imunológica envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com a DF submetidos ao TCHT alogênico. Para isso, amostras de sangue periférico de pacientes com DF tratados com o TCHT foram coletadas antes e em diversos períodos após o transplante (1 mês, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 meses). Em seguida, foram avaliados: a enxertia por meio da quantificação do quimerismo de células nucleadas; a porcentagem de hemoglobinas; a expressão de moléculas de adesão em eritrócitos e em reticulócitos; níveis plasmáticos de biomarcadores da DF; a expressão gênica diferencial de genes envolvidos com a resposta inflamatória; frequências e números absolutos de subpopulações linfocitárias e mieloides no sangue periférico; os níveis plasmáticos de biomarcadores da DECH. A maioria dos pacientes atingiu o quimerismo misto e se mantiveram quimeras mistas até 5 anos após o transplante. Dos 40 pacientes avaliados, 8 perderam o enxerto, 14 desenvolveram DECH aguda (DECHa) e 6 DECH crônica (DECHc). Todos pacientes que tiveram DECH aguda ou crônica desenvolveram os sintomas leves da doença e foram facilmente tratados. Após o TCHT, houve redução da resposta inflamatória crônica, da expressão de moléculas de adesão na superfície das células vermelhas (hemácias e reticulócitos), da frequência de reticulócitos e da porcentagem de hemoglobina S. Os pacientes que perderam o enxerto após o transplante apresentaram maior frequência de células supressoras derivadas da linhagem mielóide monocíticas (MDSC-M) 1 mês após o transplante, maior número de iNKT 3 meses após o transplante, menor número de células T CD8+PD-1+ exaustas 12 meses após o transplante e menor número de células T CD8+CD28-CD57+ 24 meses após o transplante, comparado aos pacientes que não perderam o

enxerto. Também foi observado aumento de células T reguladoras (células T CD4+CD25hiGITR+, T CD8+CD28-CD57+ e T CD8+CD28-FOXP3+) após o transplante em pacientes que não perderam o enxerto, comparado ao pré-transplante. Além disso, pacientes com DECHa apresentaram aumento da concentração de IL-15, IL-22, CD25/IL2R α , April, HGF e ST2 após o transplante comparado ao pré-transplante. Pacientes que desenvolveram DECHa tiveram redução dos números de células T CD4+ e CD8+ exaustas, expressando PD-1, 1 mês após o TCTH e aumento de células iNKT 3 meses após o TCTH comparado aos pacientes que não tiveram DECH. Comparado ao pré-transplante, pacientes com DECHa tiveram expansão de MDSC-M e MDSC-G 1 mês após o transplante. Em conclusão, com base nas avaliações imunológicas e hematológicas realizadas, nosso trabalho demonstrou melhora significativa do quadro inflamatório crônico, os pacientes com DF que não desenvolveram DECH e/ou não perderam o enxerto apresentaram uma expressiva expansão de células T reguladoras (células T CD4+CD25hiGITR+, T CD8+CD28-CD57+ e T CD8+CD28-FOXP3+) e de células T exaustas durante a reconstituição imunológica, sugerindo importante função dessas células no estabelecimento da tolerância imunológica duradoura após o TCTH alogênico nesses pacientes.

Palavras-chave: Doença falciforme. Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. Reconstituição hematológica. Reconstituição imunológica. Doença do enxerto contra o hospedeiro. Falha da enxertia.

Abstract

de Azevedo, Júlia Teixeira Cottas. **Immunological and hematological profiles of sickle cell disease patients treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** 2018. 215f. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Sickle cell disease (SCD) is a monogenic disease, one of the most prevalent in the world, caused by one point mutation at position 6 of the β -globin gene, which results in abnormal production of hemoglobin S. Currently, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only curative option available for patients with SCD. However, few studies have evaluated the mechanisms of action involved in different therapeutic responses of SCD patients treated with allogeneic HSCT. Additionally, although the immune system plays a central role in HSCT, there is no study correlating immune reconstitution patterns with the development of graft versus host disease (GVHD) and graft maintenance in SCD transplanted patients. Thus, in this work, we have evaluated the mechanisms of hematological and immunological reconstitution involved in therapeutic response of SCD patients submitted to allogeneic HSCT. For this purpose, peripheral blood samples from SCD patients treated with HSCT were collected before and at various periods after transplantation (1 month, 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 60 months). Then, we have evaluated the: grafting by quantification the nucleated cells chimerism; percentage of hemoglobin; expression of adhesion molecules in erythrocytes and reticulocytes; plasma levels of SCD biomarkers; differential expression of genes associated with inflammatory response; frequencies and absolute numbers of lymphocyte and myeloid subpopulations in peripheral blood; and plasma levels of GVHD biomarkers. The majority of patients maintained mixed chimerism until 5 years after transplantation. Of the 40 patients evaluated, 8 had graft failure, 14 developed acute GVHD (aGVHD) and 6 had chronic GVHD (cGVHD). All patients with acute or chronic GVHD developed mild symptoms of the disease and were easily treated. The chronic inflammatory response, the expression of adhesion molecules on the red cell surface (mature red blood cells and reticulocytes), the reticulocyte frequency and the hemoglobin S percentage were decreased after HSCT. Patients with graft failure had higher frequency of monocytic myeloid-derived suppressor cells (MDSC-M) 1 month after transplantation, higher number of iNKT 3 months after transplantation, lower number of CD8+PD-1+ T cells 12 months after transplantation and lower number of CD8+CD28+CD57+ T cells 24 months after transplantation than grafted patients. Increased numbers of regulatory T cells (CD4+CD25^{hi}GITR+, CD8+CD28-CD57+ and CD8+CD28-FOXP3+ T cells) were also observed after transplantation in grafted patients compared to pre-transplantation period. In addition, patients with aGVHD showed increased levels of IL-15, IL-22, CD25/IL2R α , APRIL, HGF and ST2 after transplantation compared to baseline. Patients with aGVHD had lower numbers of exhausted CD4+PD-1+ and

CD8+PD-1+ T cells 1 month after HSCT and higher numbers of iNKT cells 3 months after HSCT than non-GVHD patients. Patients with aGVHD had expansion of MDSC-M and MDSC-G at 1 month after transplantation compared to pre-transplantation period. In conclusion, based on the immunological and hematological evaluations, our study has demonstrated that allogeneic HSCT has therapeutic efficacy in patients with SCD. In addition to significant improvement in the chronic inflammatory condition, SCD patients without GVHD and/or without graft failure showed relevant expansions of regulatory T cells (CD4+CD25^{hi}GITR+T cells, CD8+CD28-CD57+T cells and CD8+CD28+FOXP3+T cells) and exhausted T cells during immunological reconstitution process, suggesting an important role of these cells in establishing sustained immune tolerance state after allogeneic HSCT in these patients.

Keywords: Sickle cell disease. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Hematological reconstitution. Immune reconstitution. Graft *versus* host disease. Graft failure.

Lista de abreviaturas e siglas

ACTB – do inglês “*Actin beta*” ou beta actina

ACVRL1 - do inglês “*activin A receptor type II-like 1*” receptor da activina A do tipo II-like 1

ADA - adenosina desaminase

AF - Anemia falciforme

April - do inglês “*proliferation-inducing ligand*” ou ligante indutor de proliferação

APC - do inglês “*antigen presenting cell*” ou células apresentadoras de antígenos

ATG - do inglês “*anti-thymocyte globulin*” ou globulina antitimocitária

ATP - adenosina trifosfato

BAFF – do inglês “*B-cell activating factor*” ou fator ativador de células B

BCL6 - do inglês “*B-cell CLL/lymphoma 6*”

BMPR2 - do inglês “*bone morphogenetic protein receptor 2*” ou receptor da proteína morfogenética óssea 2

BMP6 - do inglês “*bone morphogenetic protein 6*” ou proteína morfogenética óssea 6

B2M – do inglês “*Beta-2-microglobulin*” ou beta-microglobulina 2

CCL- do inglês “*C-C motif chemokine ligand*”

CCR – do inglês “*C-C motif chemokine receptor*”

CD - do inglês “*cluster of differentiation*”

CEBPB – do inglês “*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) beta*”

CRP – do inglês “*C-reactive protein*” ou proteína C reativa

CSF1 – do inglês “*Colony stimulating factor 1*” ou fator estimulador de colônia 1

Ct - do inglês “*threshold cycle*”

CTH - células-tronco hematopoéticas

CTLA-4 - do inglês “*cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*” ou molécula 4 associada ao linfócito T citotóxico

CXCL – do inglês “*C-X-C motif chemokine ligand*”

CXCR – do inglês “*C-X-C chemokine receptor*”

C3 – do inglês “*complement component 3*” ou componente 3 do complemento

C3AR1 - do inglês “*complement component 3a receptor 1*” ou receptor 1 do componente 3a do complemento

DAMP - do inglês “*damage-associated molecular patterns*” ou padrões moleculares associados ao dano

DF - Doença falciforme

DNA - do inglês "*desoxiribonucleic acid*" ou ácido desoxirribonucleico

DECH - doença do enxerto contra o hospedeiro

FASLG do inglês "*Fas ligand*" ou ligante de Fas

FOXP3 - do inglês "*forkhead box P3*"

GAPDH - do inglês "*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*" ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

G-CSF - do inglês "*granulocyte-colony stimulating factor*" ou fator estimulador de colônias de granulócitos

GITR - do inglês "*glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor*" ou receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide

GITRL - do inglês "*glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor ligand*" ou ligante do receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide

GM-CSF - do inglês "*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*" fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

Hb - hemoglobina

HGDC - do inglês "*Human Genomic DNA Contamination*"

HGF - do inglês "*hepatocyte growth factor*" ou fator de crescimento de hepatócitos

HK - do inglês "*Housekeeping gene*"

HLA - do inglês "*human leukocyte antigen*" ou antígeno leucocitário humano

HPLC - do inglês "*high performance liquid chromatography*" ou cromatografia líquida de alta eficiência

HPRT1 - do inglês "*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*"

HU - hidroxureia

ICAM-1 - do inglês "*intercellular adhesion molecule 1*" ou molécula de adesão celular-vascular 1

IFN- γ - do inglês "*gamma interferon*" ou interferon gama

IL - interleucina

IL-2R α - do inglês "*IL-2 receptor alpha chain*" subunidade alfa do receptor da IL-2

iNKT - do inglês "*T cells natural killers invariant*" ou células T matadoras naturais invariantes

ITGB2 - do inglês "*Integrin beta 2*" ou integrina beta 2

KNG1 - do inglês "*Kininogen 1*" ou cininogenio

LDH - lactato desidrogenase

LIP - do inglês "*lymphopenia induced proliferation*" ou proliferação induzida por linfopenia

LPS - lipopolissacarídeo

LTA - do inglês "*Lymphotoxin alpha*" ou linfotóxina alfa

LTB - do inglês "*Lymphotoxin beta*" ou linfotóxina beta

LY96 - do inglês "*Lymphocyte antigen 96*"

MAC - do inglês "*myeloablative conditioning*" ou condicionamento mieloablativo

MCP-1 - do inglês "*monocyte chemoattractant protein-1*" ou proteína quimioatraente de monócitos-1

MDSC - do inglês "*myeloid-derived suppressor cells*" ou células supressoras derivadas da linhagem mieloide

MHC - do inglês "*major histocompatibility complex*" ou complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1 α - do inglês "*macrophage inflammatory protein- 1 alpha*" ou proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa

MIP-1 β - do inglês "*macrophage inflammatory protein- 1 beta*" ou proteína inflamatória de macrófagos 1 beta

MYD88 – do inglês "*Myeloid differentiation primary response 88*" ou fator de diferenciação mieloide 88

NET – do inglês "*neutrophil extracellular traps*"

NFKB1 – do inglês "*Nuclear factor kappa B subunit 1*" ou subunidade 1 do fator nuclear Kapp B

NK - do inglês "*natural killers*" ou matadoras naturais

NMA - do inglês "*non-myeloablative conditioning*" ou condicionamento não mieloablativo

NO - do inglês "*nitric oxide*" ou óxido nítrico

NOS2 – do inglês "*nitric oxide synthases 2*" ou enzima óxido nítrico sintase 2

NR3C1 - do inglês "*Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*"

NRT – do inglês "*No Reverse Transcription Control*"

NTC – do inglês "*No Template Control*"

PAMP – do inglês "*pathogen-associated molecular pattern*" ou padrões moleculares associados à patógenos

PBMC - do inglês "*peripheral blood mononuclear cells*" ou células mononucleares de sangue periférico

PBS - do inglês "*phosphate buffer saline*" ou tampão salina fosfato

PCR - do inglês "*polymerase chain reaction*" ou reação de polimerização em cadeia

PD-1 - do inglês "*programmed cell death 1*" ou proteína de morte celular programada 1

PDL-1 - do inglês "*programmed cell death-ligand 1*" ou ligante da proteína de morte celular programada 1

PDL-2 - do inglês "*programmed cell death-ligand 2*" ou ligante da proteína de morte celular programada 2

PPC - do inglês "*Positive PCR Control*"

PTGS2 - do inglês "*Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*" ou prostaglandina endoperoxídeo sintase 2

Reg3 α - do inglês "*regenerating islet-derived protein 3 alpha*" ou membro 3 alfa da família de regeneração

RIC - do inglês "*reduced-intensity conditioning*" condicionamento de intensidade reduzida

RIPK2 - do inglês "*Receptor-interacting serine-threonine kinase 2*" ou receptor RIP da família da serina/treonina proteína quinase

RNA - do inglês "*ribonucleic acid*" ou ácido ribonucleico

RPLP0 – do inglês "*Ribosomal protein large P0*"

RTC - do inglês "*Reverse Transcription Control*"

RTE - do inglês "*recent thymic emigrant*" ou recém emigrantes do timo

SARA - síndrome da angústia respiratória do adulto

SELE - Selectina E

STA - síndrome torácica aguda

STR - do inglês "*short tandem repeat*"

ST2 - do inglês "*suppression of tumorigenicity 2*" ou fator de supressão da tumorigenicidade

TA - temperatura ambiente

TCTH - transplante de células-tronco hematopoéticas

TGF- β – do inglês "*transforming growth factor beta*" ou fator de crescimento transformante beta

TGI - trato gastrointestinal

TIRAP – do inglês "*Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*" ou proteína adaptadora contendo domínio TIR

TNF- α - do inglês "*tumor necrosis factor alpha*" ou fator de necrose tumoral alfa

TNFSF14 – do inglês "*Tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 14*"

TOLLIP – do inglês "*Toll interacting protein*" ou proteína de interação Toll

TLR – do inglês "*Toll-like receptor*" ou receptor do tipo *toll*

VCAM-1 - do inglês "*vascular-cell adhesion molecule 1*" ou molécula de adesão intercelular 1

VOC - vaso-oclusão

XO - xantina

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Doença falciforme	17
1.2	Modalidades terapêuticas na doença falciforme	21
1.3	Reconstituição imunológica após o TCTH alogênico e o desenvolvimento da DECH	23
1.4	Justificativa e hipótese do estudo	27
2	Objetivos	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	Delineamento Experimental	32
4	Casuística, Material e Métodos	33
4.1	Pacientes com doença falciforme e indivíduos saudáveis	33
4.2	Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	34
4.3	Extração de DNA das células mononucleares do sangue periférico	34
4.4	Análise de quimerismo das células nucleadas do sangue periférico	35
4.5	Extração de RNA a partir das células mononucleares do sangue periférico	35
4.6	Validação da integridade e qualidade do RNA	36
4.7	Transcrição reversa do RNA	36
4.8	RT ² Profiler PCR array	36
4.9	Dosagem de biomarcadores inflamatórios no plasma	38
4.10	Dosagem de biomarcadores da DF e da DECH no plasma	39
4.11	Dosagem de TGF- β no soro	40
4.12	Dosagem indireta de óxido nítrico no soro	40
4.13	Hemograma e cromatografia líquida de alta eficiência	41
4.14	Avaliação da frequência de reticulócitos e expressão de moléculas de adesão em células vermelhas	41
4.15	Imunofenotipagem de subpopulações celulares do sangue periférico	42

4.16	Análise dos resultados	43
5	Resultados	46
5.1	Resposta clínica dos pacientes com DF tratados com TCTH alogênico	46
5.2	Avaliação da enxertia nos pacientes com DF após o tratamento com o TCTH	52
5.3	Reconstituição hematológica e modulação de biomarcadores da DF nos pacientes com DF após tratamento com TCTH	55
5.3.1	Avaliação global da reconstituição de células vermelhas em pacientes com DF após o TCTH alogênico.....	55
5.3.2	Comparação entre os grupos “falha da enxertia” e “enxertia”	61
5.4	Expressão diferencial de genes envolvidos com a resposta inflamatória em pacientes com DF tratados com TCTH.....	67
5.5	Reconstituição imunológica de pacientes com DF após o TCTH.....	77
5.5.1	Comparação entre a reconstituição imunológica de pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o transplante	91
5.5.2	Comparação entre a reconstituição imunológica de pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH após o transplante	105
6	Discussão	140
7	Resumo dos resultados obtidos	164
8	Conclusão	167

Introdução

1 Introdução

1.1 Doença falciforme

A doença falciforme (DF) foi descrita pela primeira vez por Herrick em 1910 (Herrick, 1910). Trata-se de uma das doenças monogênicas mais comuns no mundo, afetando aproximadamente 7% da população mundial (revisado em Mccavit, 2012). Estima-se que cerca de 300 mil crianças tenham nascido com a DF no ano de 2010, sendo que dois terços desses nascimentos ocorreram na África (Piel *et al.*, 2013). No Brasil, estima-se que 20 a 30 mil brasileiros sejam portadores da DF (Simões *et al.*, 2010).

É uma doença causada por uma mutação pontual na posição 6 do gene codificador da cadeia da β -globina, em que há a substituição de adenina por timina (GAG→GTG), codificando valina ao invés de ácido glutâmico. Essa mutação leva a modificações físico-químicas na molécula da hemoglobina (Hb), originando a hemoglobina S anormal (HbS), ao invés da hemoglobina normal denominada hemoglobina A (HbA) (Frenette e Atweh, 2007; Dos Santos *et al.*, 2011; Kohne, 2011; Dos Santos *et al.*, 2012; Mccavit, 2012; Ware, 2013b).

A forma mais comum da DF é a anemia falciforme (AF), que ocorre em cerca de 83% dos casos, na qual a HbS se encontra em homozigose, ou seja, a mutação ocorre nos dois alelos codificadores da β -globina. Entretanto, outras formas da DF podem existir, como a hemoglobinopatia SC, hemoglobinopatia SD, S/beta-talassemia, nas quais o gene da HbS está em heterozigose e combinado com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como a hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD) e β -talassemia, respectivamente (Frenette e Atweh, 2007; Rees *et al.*, 2010; Kohne, 2011; Mccavit, 2012; Piel *et al.*, 2013).

Trata-se de uma doença bastante heterogênea, com a frequência e a gravidade das complicações clínicas variando entre os diferentes pacientes e entre as diferentes formas, sendo vários fatores associados à essa heterogeneidade fenotípica, como fatores socioeconômicos, ambientais, nutricionais e genéticos (Frenette e Atweh, 2007; Zago e Pinto, 2007; Rees *et al.*, 2010). Polimorfismos associados ao gene da adenosina desaminase (ADA) tem sido descritos na DF, uma vez que pacientes com AF portadores do alelo variante rs3730070-G (do gene da ADA) apresentaram menor taxa de hemólise (Cita *et al.*, 2016). Polimorfismos em genes da superfamília TGF- β , como do receptor da activina A do tipo II-like 1 (ACVRL1), do receptor da proteína morfogenética óssea 2 (BMP2) e da proteína morfogenética 6 (BMP6) e nos genes da via de sinalização TGF- β /BMP foram associados com maior risco de hipertensão pulmonar e úlceras nas pernas, respectivamente (Nolan *et al.*, 2006; Ashley-Koch *et al.*, 2008). Além disso, polimorfismos em genes envolvidos com a resposta imunológica

também vêm sendo descritos (Vicari et al., 2015), sugerindo importante papel da resposta inflamatória crônica no agravamento dos sintomas da doença.

Os principais sintomas clínicos da DF são: isquemia, crises de dor, síndrome torácica aguda (STA) e acidentes vasculares cerebrais. A crise de dor é principal característica da DF, constituindo a principal causa de morbidade e internações. A STA é a complicação aguda com maior índice de mortalidade na DF, sobretudo após dois anos de idade, sendo caracterizada pela dor na região torácica, infiltrado pulmonar, tosse, hipóxia, febre e dispneia (Frenette e Atweh, 2007; Zago e Pinto, 2007; Rees et al., 2010; Mccavit, 2012; Serjeant, 2013). Infartos cerebrais silenciosos ocorrem em cerca de 27% das crianças com DF até os 6 anos de idade, os quais são associados com a perda da função intelectual global, sendo que essa proporção aumenta para 37% aos 14 anos de idade (Debaun et al., 2012). Outras complicações comuns são: úlceras de pernas, retinopatia, dactilite, necrose óssea, cálculos de vesícula, priapismo, hipertensão pulmonar, insuficiência cardíaca, anemia hemolítica crônica e crise esplênica (Frenette e Atweh, 2007; Zago e Pinto, 2007; Rees et al., 2010; Dos Santos et al., 2011; Kohne, 2011; Dos Santos et al., 2012; Serjeant, 2013; Ware, 2013b). A aumento da suscetibilidade a infecções, sobretudo por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Klebsiella sp.*, também é bastante característico de pacientes com DF, uma vez que grande parte desses pacientes perdem o baço em torno dos 5 anos de idade (Brousse et al., 2014).

A vaso-oclusão (VOC) é o principal evento associado aos sintomas da DF e ocorre devido ao aumento da adesão de hemácias ao endotélio e à outras células do sistema sanguíneo. A HbS possui resíduos hidrofóbicos em suas cadeias β , devido a substituição do Ácido glutâmico (aminoácido hidrofílico) pela Valina (aminoácido hidrofóbico) e, em baixas concentrações de oxigênio, essas cadeias interagem entre si, polimerizando-se rapidamente (Zago e Pinto, 2007; Rees et al., 2010; Dos Santos et al., 2012; Mccavit, 2012; Ware, 2013b). A polimerização da HbS desoxigenada resulta na alteração da arquitetura e da flexibilidade celular das hemácias, dificultando sua circulação pelos vasos sanguíneos e favorecendo a formação de trombos e, conseqüentemente, a oclusão dos vasos. A alteração na arquitetura celular mais conhecida é provocada por feixes de polímeros que se organizam mais ou menos paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada” (Stuart e Nagel, 2004; Zago e Pinto, 2007; Rees et al., 2010; Dos Santos et al., 2012; Mccavit, 2012; Ware, 2013b).

Além de formar polímeros entre si, a HbS também pode se polimerizar com proteínas da membrana (em especial da banda 3), o que causa o rearranjo da membrana celular com conseqüente aumento da exposição de moléculas de adesão (como a fosfatidilserina, CD36, CD47, CD49d, BCAM/LU). O aumento da expressão dessas moléculas na superfície celular provoca o aumento da

adesão de hemácias ao endotélio, amplificando o processo de VOC e culminando na isquemia tecidual e em uma cascata adicional de eventos patológicos, incluindo hemólise, disfunção endotelial, inflamação, hipercoagulabilidade, estresse oxidativo, dano por reperfusão e hipoxemia (Frenette e Atweh, 2007; Zago e Pinto, 2007; Rees *et al.*, 2010; Odièvre *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2012).

Uma consequência muito comum da VOC é o dano tecidual causado pela reperfusão. Devido à oclusão de vasos sanguíneos, o suprimento de oxigênio em alguns órgãos é prejudicado (hipóxia). A baixa concentração de O_2 disponível nos diferentes tecidos resulta na distribuição insuficiente de nutrientes e na produção de radicais livres e, quando há a retomada do fluxo sanguíneo (reperfusão), ocorre a reoxigenação do tecido. Em condições de hipóxia tecidual, a adenosina trifosfato (ATP) é catabolizada induzindo a produção local de hipoxantina e xantina (XO). Com a restauração do fluxo sanguíneo e do suprimento de O_2 , há a reação entre hipoxantina e XO com o O_2 , o que resulta na produção de radicais livres, aumentando o estresse oxidativo e a resposta inflamatória local (Chirico e Pialoux, 2012).

Além disso, a alteração na estrutura das hemácias também pode resultar na desregulação de canais iônicos (como os canais de K-Cl e de Gardos), sendo que em pacientes com DF é descrito o efluxo de potássio e o aumento do cálcio intracelular e de membrana, o que leva à desidratação celular, que por sua vez aumenta a concentração intracelular de Hb, favorecendo a polimerização da HbS desoxigenada (Odièvre *et al.*, 2011). A desidratação, acompanhada do enrijecimento da membrana e de toda a hemácia, culmina na hemólise crônica de eritrócitos falciformes, liberando hemoglobina livre, lactato desidrogenase (LDH) e arginase no plasma, o que reduz a concentração plasmática de óxido nítrico (NO). A própria hemoglobina livre consome o NO do plasma, enquanto a arginase reduz a concentração de Arginina no plasma, a qual atua como substrato para a síntese de NO pelas células endoteliais. A arginase e a LDH são frequentemente utilizadas como marcadores de hemólise e também estão diretamente relacionadas com o aumento da adesão das hemácias (Akinsheye e Klings, 2010; Chirico e Pialoux, 2012).

O NO é importante regulador do tônus muscular produzido pelas células endoteliais. O NO também é capaz de inibir a ativação e a agregação plaquetária, além de apresentar propriedades antioxidantes. A depleção de substrato e o sequestro de NO causam redução local desta substância e vasoconstrição. O fenômeno de vasoconstrição, por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo e favorece a falcização das hemácias. Tem sido proposto que a deficiência de NO seja a o fator principal da causa da vasculopatia e da disfunção endotelial que ocorre na DF (Zago e Pinto, 2007; Akinsheye e Klings, 2010; Odièvre *et al.*, 2011; Chirico e Pialoux, 2012; Rees e Gibson, 2012). O NO também é capaz de reagir com radicais livres, como o superóxido O_2^- , que estão em elevadas concentrações em pacientes com doenças falciformes. A reação de NO com O_2^- além de reduzir a concentração do NO, resulta na

produção do peroxinitrito, um potente agente oxidante, que produz mais radical livre (Chirico e Pialoux, 2012).

Quando a hemácia é lisada, há também a liberação do grupo heme e de Fe^{3+} , amplificando o estresse oxidativo característico da DF. O aumento da produção de radicais livres pode induzir a expressão de fatores de transcrição como NF- κ B e a proteína ativadora-1, que por sua vez induzem a expressão de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 no endotélio, contribuindo também para a adesão dos leucócitos ao endotélio (Frenette e Atweh, 2007; Chirico e Pialoux, 2012; Dos Santos *et al.*, 2012).

Além disso, estudos recentes têm demonstrado que o grau de inflamação crônica também se relaciona com a severidade dos sintomas clínicos da DF, sugerindo importante papel das células do sistema imune inato na fisiopatologia da doença (Parise e Berliner, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Chen e colaboradores (2014) mostraram que neutrófilos são capazes de interagir com as hemácias, resultando na formação de agregados celulares e na liberação de NET (*neutrophil extracellular traps*), o que intensifica ainda mais o processo de VOC. Pacientes com manifestações clínicas mais severas apresentaram maiores números de neutrófilos circulantes, sendo que o número de leucócitos totais se correlacionou positivamente com infartos cerebrais silenciosos, acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos, síndrome torácica aguda e morte prematura de pacientes com DF (Castro *et al.*, 1994; Platt *et al.*, 1994; Anyaegbu *et al.*, 1998; Ohene-Frempong *et al.*, 1998; Kinney *et al.*, 1999). Além disso, alteração no número/frequência e na função de linfócitos T e B também tem sido descrita em pacientes com DF, sendo observado aumento de linfócitos totais, linfócitos T CD8+, linfócitos T CD8+ de memória, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD4+ *naive* e linfócitos T CD4+ de memória (Nickel *et al.*, 2015). O número de linfócitos B também estão aumentados nos pacientes com DF (especialmente de células B *naive*) (Kaaba e Al-Harbi, 1993; Nickel *et al.*, 2015), porém alguns estudos demonstraram função diminuída dessas células, assim como menor produção de anticorpos (Ballester *et al.*, 1985; Bjornson e Lobel, 1987; Rautonen *et al.*, 1992), o que pode contribuir para o aumento da suscetibilidade a infecções.

O endotélio vascular também constitui um fator muito importante nos processos inflamatório e de VOC nos pacientes falciformes. O endotélio lesado expõe fator tecidual, que desencadeia a cascata da coagulação e libera multímeros de von Willebrand que participam da hemostasia primária (Zago e Pinto, 2007; Odièvre *et al.*, 2011; Rees e Gibson, 2012). As células endoteliais ativadas expressam moléculas como VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular 1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1), que facilitam a adesão de células sanguíneas ao endotélio. Muitas dessas alterações de moléculas de adesão desaparecem ou se reduzem durante o tratamento com hidroxiureia, reforçando o possível papel desses achados em relação às manifestações clínicas (Zago e Pinto, 2007; Odièvre *et al.*, 2011; Rees e Gibson, 2012).

As células endoteliais também liberam endotelina-1, um peptídeo pró-inflamatório e potente vasoconstritor de grandes e pequenas artérias e veias. Durante quadros inflamatórios agudos, como síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), coagulação intravascular disseminada e sepse, os níveis plasmáticos de endotelina-1 estão elevados, assim como nos pacientes com DF. Além da ação vasoconstritora, a endotelina-1 aumenta as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis e também estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , G-CSF e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos (Odièvre *et al.*, 2011; Rees e Gibson, 2012).

1.2 Modalidades terapêuticas na doença falciforme

Grandes avanços têm sido realizados no tratamento de pacientes com DF nos últimos anos. A introdução do uso da hidroxiureia (HU), o uso profilático de penicilina, a imunização com a vacina pneumocócica conjugada e a introdução do exame doppler transcraniano contribuíram para o aumento da expectativa de vida de crianças com DF (Bernaudin *et al.*, 2011; Lanzkron *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2016). Entretanto, a DF ainda continua sendo um problema de saúde mundial, sobretudo em países em desenvolvimento, onde a doença tem maior prevalência e incidência e existem poucos recursos para o tratamento da doença, resultando em elevada taxa de mortalidade de adultos com DF (pacientes com DF ainda vivem 2 décadas a menos que indivíduos sadios) (Grosse *et al.*, 2011; Lanzkron *et al.*, 2013; Pleasants, 2014; Abraham *et al.*, 2016). Além disso, o tratamento prospectivo da DF torna-se difícil, uma vez que o nível de hemoglobina fetal é o único marcador de melhor prognóstico da doença (Bhatia e Sheth, 2015).

Atualmente, as formas de terapia aprovadas para o tratamento da DF são o uso de HU, transfusões sanguíneas e o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (TCHT), sendo este último a única forma capaz de curar esses pacientes. A aprovação do uso da HU, em 1998, para o tratamento de pacientes com DF trouxe grande mudança na qualidade e na expectativa de vida desses pacientes, sobretudo em países desenvolvidos, resultando na redução da frequência de internações, das crises de dor agudas e das transfusões sanguíneas (Charache *et al.*, 1992; Charache *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2011; Lobo *et al.*, 2013; Ware, 2013a). O principal efeito da HU no tratamento de pacientes com DF é a indução da produção da hemoglobina fetal (HbF), a qual impede a polimerização da HbS (Platt *et al.*, 1984). Entretanto, a redução do número de leucócitos e plaquetas e a diminuição da expressão de moléculas de adesão (tal como o ICAM-1), indução da liberação de NO na circulação sanguínea e diminuição da expressão de BCL11A (fator de transcrição inibidor do gene da hemoglobina fetal) também foram reportados (Nahavandi *et al.*, 2002; Conran *et al.*, 2004; Cartron e Elion, 2008; Rees *et al.*, 2010; Flanagan *et al.*, 2012). Apesar dos benefícios da HU, é importante

ressaltar que nem todos os pacientes respondem a esse tratamento e toxicidades crônicas estão associadas ao seu uso (Bakanay *et al.*, 2005; McGann e Ware, 2011; Lobo *et al.*, 2013; Ware, 2013a).

Outra forma de tratamento oferecida aos pacientes com DF são as transfusões sanguíneas crônicas, as quais são eficientes na prevenção de acidente vasculares cerebrais (Debaun *et al.*, 2014), uma vez que a transfusão resulta no aumento da concentração de HbA (oriunda do doador) e diminuição da concentração de HbS. A transfusão sanguínea também causa a supressão da produção endógena de eritropoetina e, conseqüentemente, reduz a produção de novas hemácias contendo HbS, diminuindo ainda mais a concentração dessa hemoglobina na circulação (Wayne *et al.*, 1993; Nifong e Domen, 2002). Entretanto, transfusões sanguíneas podem resultar em elevadas taxas de aloimunização, transmissão de doenças infecciosas, sobrecarga de ferro e, assim como a HU, não são capazes de curar esses pacientes (Booth *et al.*, 2010; Chou e Fasano, 2016).

Nas últimas décadas, pacientes com DF têm sido efetivamente tratados com o TCTH (Walters *et al.*, 1996; Vermeylen *et al.*, 1998; Panepinto *et al.*, 2007; Locatelli *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2014). Embora algumas limitações ainda existam, como o elevado custo do procedimento, necessidade de doador compatível, imunoablação decorrente do regime de condicionamento, toxicidade, ocorrência de infecções e desenvolvimento da DECH (doença do enxerto contra o hospedeiro) após o transplante, avanços nas medidas de suporte de vida nos hospitais, nas drogas usadas nos regimes de condicionamento e na profilaxia do DECH têm reduzido a taxa de mortalidade relacionada ao transplante, tornando-a igual ou menor que a taxa de mortalidade de pacientes com DF e permitindo que essa forma de tratamento seja cada vez mais considerada entre os pacientes com DF (revisado em Hsieh *et al.*, 2011; revisado em Bhatia e Sheth, 2015; revisado em Kassim e Sharma, 2017).

Aproximadamente 1200 pacientes com DF já foram transplantados no mundo inteiro, sendo a maioria dos transplantes realizados com doadores aparentado e HLA (antígeno leucocitário humano) compatíveis (Bhatia e Sheth, 2015; Gluckman *et al.*, 2017). Um estudo recente avaliou a eficiência do transplante em 1000 pacientes com DF tratados entre 1986 e 2013 (média de segmento de 55 meses) nos principais centros do mundo (Gluckman *et al.*, 2017). Nesse estudo, foram analisados somente pacientes que receberam as células-tronco provenientes de doadores HLA-compatíveis aparentados (isoladas da medula óssea, do sangue periférico ou de cordão umbilical) e que foram tratados com regime de condicionamento mieloablativo (MAC) ou de intensidade reduzida (RIC). As probabilidades de sobrevivência e de sobrevivência livre de eventos (complicações pós-transplante ou progressão da doença) 5 anos após o transplante foram de 92,9% e 91,4% respectivamente, enquanto a incidência cumulativa de DECH agudo (grau II-IV) foi 14,8% e de DECH crônico foi de 14,3%. Além disso, apenas 2,3% dos pacientes rejeitaram o enxerto, confirmando a eficácia e segurança do transplante no tratamento da DF (Gluckman *et al.*, 2017).

Recentemente, estudos pré-clínicos e clínicos de fase 1/2 utilizando a terapia gênica para o tratamento da DF vêm sendo realizados (revisado em Fernandes, 2017). Brendel e colaboradores (2016), com o objetivo de induzir o aumento da produção de HbF, construíram um vetor lentiviral específico para linhagem de células vermelhas e que carrega um *short hairpin* RNA específico para BCL11A (fator envolvido com a supressão da expressão da HbF). As células-tronco hematopoéticas de camundongos e humanos foram eficientemente transduzidas por esse vetor e infundidas em camundongos, os quais tiveram a expressão de HbF aumentada (Brendel *et al.*, 2016). Outro estudo, utilizando o sistema CRISPR/Cas9, foi capaz de induzir uma mutação numa sequência de 13 nucleotídeos presentes na região promotora dos genes da γ -globina (HBG1 e HBG2) e, desse modo, promover a expressão de HbF em células-tronco hematopoéticas de pacientes com DF *in vitro* (Traxler *et al.*, 2016).

Em um estudo clínico de fase 1/2, as células-tronco hematopoéticas de pacientes com DF foram isoladas e geneticamente modificadas utilizando o vetor lentiviral BB305, que expressa o gene da β -globina humana modificada (β^{T87Q}), o qual carrega um aminoácido derivado da γ -globina capaz de impedir a polimerização da HbS. Em seguida, os pacientes foram tratados com bussulfano (regime de condicionamento mieloablativo) e as células-tronco hematopéticas modificadas foram infundidas. Foi observado que o vetor se integrou de forma segura ao genoma, porém de forma não eficiente, uma vez que foi detectado reduzido número de cópias desse vetor no sangue periférico dos pacientes com DF, resultando em nenhum benefício clínico (exceto em um paciente que foi curado) (Kanter *et al.*, 2016; Ribeil *et al.*, 2017). Embora esses trabalhos venham demonstrado resultados iniciais promissores, grandes desafios ainda precisam ser superados para o estabelecimento da terapia gênica como uma forma de tratamento para os pacientes com DF. Dentre esses desafios tem-se: o uso de regimes de condicionamentos mieloablativos com altas taxas de toxicidade associadas; a necessidade da coleta das células-tronco diretamente na medula, uma vez que pacientes com DF desenvolveram severos efeitos adversos durante mobilização dessas células para a periferia com o uso de G-CSF e o baixo rendimento na coleta de células da medula óssea de pacientes com DF, pois há grande formação de agregados celulares (provavelmente influenciado pelo microambiente inflamatório da medula óssea); avaliações de segurança e eficácia clínica do uso de vetores virais (Hoban *et al.*, 2016; Cavazzana *et al.*, 2017; Fernandes, 2017).

1.3 Reconstituição imunológica após o TCTH alogênico e o desenvolvimento da DECH

O TCTH alogênico tem se mostrado como uma estratégia terapêutica promissora não só para o tratamento da DF, mas também para outras doenças hematológicas (Passweg *et al.*, 2012; Sobh *et al.*, 2016). A eficácia TCTH alogênico é dependente do desenvolvimento da tolerância imunológica

recíproca entre células do doador e do receptor. O mecanismo responsável por esta tolerância recíproca envolve o quimerismo sustentado de células imunocompetentes do doador no organismo do receptor, que resulta em reeducação tímica das células alorreativas do doador e do receptor, prevenindo seu envolvimento em respostas imunológicas patogênicas. Ao mesmo tempo, é necessário ocorrer a reconstituição imunológica adequada para o reconhecimento e controle de agentes infecciosos e a eliminação de células patogênicas (neoplásicas, autoimunes ou portadoras de distúrbios hereditários) residuais do receptor que resistiram ao condicionamento (Voltarelli *et al.*, 2009; Alpdogan e Van Den Brink, 2012). Recentemente, estudos avaliando o potencial de diferentes células regulatórias (derivadas da linhagem mieloide, células T CD4+ e CD8+ reguladoras, células T matadoras naturais e células mesenquimais estromais) no controle da resposta alogênica pós-TCTH têm revelado resultados promissores, demonstrando que o balanço entre as células efectoras aloespecíficas e as células reguladoras da resposta imunológica é de extrema importância para manutenção do enxerto e não desenvolvimento da DECH (revisado em Papp *et al.*, 2017). Nesse sentido, entender as características e reconstituição diferencial dessas diferentes subpopulações celulares se torna essencial para a aplicação mais ampla do TCTH (revisado em Papp *et al.*, 2017).

A DECH é a principal causa de morbidade e mortalidade associada ao TCTH alogênico, atingindo cerca de 40-60% dos pacientes tratados com o transplante (Jenq e Brink, 2010; Jagasia *et al.*, 2012; Sung e Chao, 2013). Trata-se de uma síndrome complexa em que as células do sistema imunológico do doador desenvolvem resposta contra as células do receptor. O principal fator de risco associado ao desenvolvimento da DECH é o reconhecimento das moléculas de HLA pelas células T do doador. A frequência de DECH está diretamente relacionada à incompatibilidade de HLA entre o doador e receptor, sobretudo do HLA-A, -B, -C e -DRB1 (Lee *et al.*, 2007). Além disso, cerca de 40% dos casos em que há compatibilidade completa entre o HLA do doador e receptor (chamado de 8/8) ainda desenvolvem a DECH, sobretudo devido ao reconhecimento dos antígenos de histocompatibilidade menor, os quais são peptídeos derivados de proteínas altamente polimórficas ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Ferrara *et al.*, 2009; Sung e Chao, 2013). Outros fatores associados ao desenvolvimento da DECH são: o sexo (o risco de DECH é aumentado em receptores do sexo masculino que recebem a medula de doadores do sexo feminino), a idade (maior risco de DECH em pacientes mais velhos), fonte da células-tronco (menor incidência de DECH com uso de cordão umbilical) e intensidade do regime de condicionamento (menor incidência de DECH em regimes de intensidade reduzida) (Blazar *et al.*, 2012).

A DECH pode ser classificada em aguda e crônica. A doença na forma aguda é caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada, sendo mais comum nos primeiros 100 dias após o transplante (Jenq e Brink, 2010). Os principais órgãos afetados são a pele (81% dos casos), o trato

gastrointestinal (54%) e o fígado (50%) e os principais sintomas clínicos são: lesões maculopapulares, eritrodermia generalizada, dor abdominal, náusea, vômito, diarreia e hepatite colestática (Martin *et al.*, 1990; Sung e Chao, 2013; Socie e Ritz, 2014). O timo, olhos e rins também podem ser afetados na DECH aguda (Sung e Chao, 2013). Por outro lado, a DECH crônica é caracterizada pelo desenvolvimento de uma síndrome sistêmica semelhante à uma doença autoimune acompanhada de intensa fibrose que afeta principalmente a mucosa oral e ocular, a pele, o pulmão, os rins, o fígado e o intestino (Blazar *et al.*, 2012; Socie e Ritz, 2014).

Baseado na extensão dos danos e no comprometimento funcional da pele, do trato gastrointestinal e do fígado, a DECH aguda é classificada em grau I (fraco), II (moderado), III (severo) e IV (muito severo) (Ferrara *et al.*, 2009). A sobrevivência a longo prazo (5 anos) é de 25% para a doença de grau III e de 5% para a DECH de grau IV (Cahn *et al.*, 2005). Assim como na DECH aguda, baseado na severidade dos danos, a DECH crônica pode ser classificada em limitada ou difusa (Pines *et al.*, 2003; Blazar *et al.*, 2012).

Segundo o consenso do NIH (2005), a DECH aguda ainda pode ser dividida em clássica (na qual as lesões maculopapulares, os sintomas gastrointestinais e o desenvolvimento da hepatite colestática ocorrem nos primeiros 100 dias após o transplante) e em tardia, persistente ou recorrente, a qual se desenvolve após 100 dias do transplante. A DECH crônica também pode ser classificada em clássica, sem características da DECH aguda e sem limite de tempo, e na síndrome de sobreposição, em que os sintomas das DECH aguda e crônica se desenvolvem ao mesmo tempo (Socie e Ritz, 2014).

Classicamente, o desenvolvimento da DECH aguda ocorre em três etapas (Ferrara *et al.*, 2009; Jenq e Brink, 2010). A primeira fase ocorre no período de condicionamento (pré-transplante), em que os quimioterápicos e/ou radiação utilizados podem causar dano tecidual no hospedeiro com liberação de DAMP (Padrões Moleculares Associados ao Dano) e produção de citocinas pró-inflamatórias (*cytokine storm*) levando à ativação do sistema imunológico, em especial das células apresentadoras de antígenos (APC) do hospedeiro. Além disso, o regime de condicionamento pode causar dano no trato gastrointestinal, o que permite a translocação de produtos microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS) e outros Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMP), para a corrente sanguínea, amplificando a ativação das células dendríticas e macrófagos. Na segunda etapa, as APC do hospedeiro ativam as células T do doador, as quais se diferenciam, proliferam e migram para os órgãos alvo, onde desempenham suas funções efetoras, o que resulta no dano tecidual característico da terceira fase da DECH aguda. As células T CD8⁺ são as principais células envolvidas com a morte celular do hospedeiro (citotoxicidade celular), contudo os diferentes subtipos de células T CD4⁺ (Th1, Th2 e Th17) também contribuem com a patogênese da DECH por meio da produção de citocinas e

quimiocinas (Ferrara *et al.*, 2009; Jenq e Brink, 2010; Markey *et al.*, 2014). Células NK (*natural killer*) e macrófagos também estão envolvidas com o desenvolvimento da resposta imunológica contra células do hospedeiro (Beres e Drobyski, 2013; Paczesny *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2013). O tratamento padrão da DECH aguda é feito pelo uso de glicocorticoides, porém o uso de outros imunomoduladores, como de ATG (globulina antitímocitária), tacrolimus e sirolimus e de anticorpos monoclonais também já foi descrito (Blazar *et al.*, 2012; Sung e Chao, 2013).

Embora a patogênese da DECH crônica ainda não esteja completamente esclarecida, sabe-se que um evento bastante importante para o seu desenvolvimento é o dano no tecido tímico, o qual pode ser causado pelo regime de condicionamento ou pela ocorrência prévia da DECH aguda. Essa lesão tecidual resulta na seleção negativa defeituosa de células T e, consequentemente, no aumento de células T alorreativas na periferia (Sakoda *et al.*, 2007). A produção de autoanticorpos também está aumentada e o número de células T reguladoras diminuído na DECH crônica (Blazar *et al.*, 2012; Socie e Ritz, 2014). Além disso, é observado uma polarização das células T para o perfil Th2, com a produção de citocinas como IL-2, TGF- β e IL-10, as quais estão envolvidas com o desenvolvimento da fibrose (Blazar *et al.*, 2012).

A falha da enxertia é outro importante fator associado à mortalidade e morbidade do TCTH (Schriber *et al.*, 2010). A falha da enxertia primária é aquela em que o paciente não se recupera da neutropenia pós-transplante, resultando em pancitopenia. Na falha da enxertia secundária, ocorre a reconstituição inicial da medula com células do doador, porém o número dessas células vai diminuindo até que ocorra a reconstituição autóloga e, em alguns casos, pancitopenia (revisado em Olsson *et al.*, 2013). Vários mecanismos podem estar associados à falha do enxerto, como toxicidade, septicemia e infecções virais, porém a rejeição imunológica é a principal causa (Mattsson *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2013). Elevado risco de falha da enxertia tem sido reportado em transplante entre indivíduos com incompatibilidade HLA e incompatibilidade ABO (Remberger *et al.*, 2007; Crocchiolo *et al.*, 2009). Células T, macrófagos e NK têm sido descritas como os principais efetores na falha da medula (Murphy *et al.*, 1987; Fowler e Gress, 2000; Kawashima *et al.*, 2017). Células T CD8⁺ provenientes do hospedeiro que sobreviveram à imunossupressão têm sido descritas como importante célula mediadora da resposta de rejeição à medula do doador (Komatsu *et al.*, 2003; Kawashima *et al.*, 2017), ao passo que as células T CD8⁺ do doador contribui com a enxertia (Martin, 1993; Gandy *et al.*, 1999). De fato, a análise de biópsias de medula de pacientes com diversas hematológicas tratados com TCTH demonstrou aumento de macrófagos ativados e linfócitos T CD8⁺ 14 dias e 30 dias após o transplante nos pacientes que perderam o enxerto. Especificamente, pacientes com maior número de macrófagos 14 dias após o transplante apresentaram maior risco de atraso na reconstituição da medula, enquanto

aumento de linfócitos T CD8+ nesse mesmo período foi associado ao maior risco de falha da enxertia (Kawashima *et al.*, 2017).

Em modelos animais, tem sido observado que as células NK do receptor também possuem importante papel na destruição das células progenitoras dos doadores, contribuindo para a rejeição do enxerto pós-transplante (Murphy *et al.*, 1987). Por outro lado, células T CD4+ reguladoras (do receptor e do doador) apresentam papel importante na manutenção da medula que foi transplantada, uma vez que foi demonstrado que a depleção das células T CD4+ reguladoras do receptor resultou na rejeição da medula óssea em camundongos (Barao *et al.*, 2006), assim como a transferência adotiva das células T CD4+ reguladoras do doador culminou em melhor enxertia (Joffre *et al.*, 2008).

1.4 Justificativa e hipótese do estudo

O transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas é uma forma segura e eficaz no tratamento da DF e, atualmente, é a única capaz de curar esses pacientes (Walters *et al.*, 1996; Bernaudin *et al.*, 2007; Lucarelli *et al.*, 2012; Gluckman *et al.*, 2017). Contudo, são poucos os trabalhos na literatura que avaliaram os mecanismos hematológicos envolvidos na resposta terapêutica dos pacientes ao TCHT alogênico. Além disso, embora o sistema imunológico tenha papel central no TCHT (revisado em Ogonek *et al.*, 2016), até o momento nenhum estudo avaliou a cinética de reconstituição imunológica em pacientes com DF em longo prazo, bem como correlacionou o padrão dessa reconstituição com o desenvolvimento da DECH e com a permanência do enxerto.

A hipótese do nosso estudo é que o TCHT tem um papel central na modulação da resposta inflamatória característica de pacientes com DF, resultando na redução de biomarcadores de inflamação. Associado a isso, hipotetizamos também que, após o transplante, há produção de hemácias maduras sadias, acompanhada da redução de reticulócitos circulantes, diminuição da adesividade dessas ao endotélio e à outras células, o que pode resultar na diminuição das crises vaso-oclusivas e, consequentemente, na melhora dos principais sintomas clínicos da doença.

Além disso, nossa hipótese é que os pacientes com DF podem apresentar diferentes perfis de reconstituição imunológica entre si, o que pode estar associado a diminuição ou não da inflamação, ao desenvolvimento ou não da DECH, e à permanência ou falha da enxertia. Dessa forma, os pacientes que apresentarem maior tolerância imunológica entre as células do doador e do receptor, mediada pela expansão de subpopulações celulares de perfil regulador, serão aqueles que terão uma enxertia duradoura de CTHs do doador e não desenvolveram a DECH.

Os resultados desse trabalho são inéditos e contribuem significativamente para o esclarecimento dos mecanismos hematológicos e imunológicos de ação do TCHT alogênico nos

pacientes com DF, o que é extremamente necessário para maior confiabilidade e aplicação mais ampla dessa terapia para essas doenças.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo geral a avaliação dos perfis de reconstituição imunológica e hematológica envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com a DF tratados com transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a enxertia pós-TCTH alogênico pela quantificação do quimerismo de células nucleadas nos pacientes com DF;
- Avaliar parâmetros hematológicos nos pacientes com DF tratados com TCTH alogênico pela quantificação de hemoglobina, quantificação da expressão de moléculas de adesão em eritrócitos e em reticulócitos e dosagem plasmática de biomarcadores da DF, antes e após o transplante;
- Avaliar a modulação da resposta inflamatória em pacientes com DF tratados com TCTH alogênico pela análise da expressão diferencial de genes envolvidos com a resposta inflamatória e da dosagem plasmática de citocinas pró- e anti-inflamatórias, antes e após o transplante;
- Avaliar os perfis de reconstituição imunológica de pacientes com DF após TCTH alogênico pela quantificação da frequência e do número absoluto de subpopulações linfocitárias e mieloides no sangue periférico e dosagem plasmática de biomarcadores da DECH antes e após o transplante;
- Relacionar todos os parâmetros hematológicos, inflamatórios e imunológicos acima avaliados nos pacientes com DF que: desenvolveram ou não DECH aguda ou crônica; que perderam ou não o enxerto.

Casuística, Material e Métodos

3 Delineamento Experimental

Amostras de sangue periférico de pacientes com DF tratados com o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da FMRP-USP foram coletadas antes e em diversos períodos após o transplante (1 mês, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 meses). Foram colhidos, em cada período, 20mL de sangue periférico de pacientes com DF em tubos com EDTA para o isolamento de células mononucleares (e posterior extração de DNA e RNA), 12mL de sangue periférico em tubos com heparina para realização da citometria de fluxo e obtenção de plasma e 4 mL em tubos sem anticoagulante para a separação do soro. Paralelamente, foram colhidos, uma única vez, as mesmas quantidades de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

Em seguida, foram feitas as avaliações: da porcentagem de células mononucleares do doador até 5 anos após o transplante (quimerismo celular); da expressão diferencial de genes envolvidos com a resposta inflamatória antes e até 1 ano após o transplante; dos níveis plasmáticos de biomarcadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α e MIP-1 β) antes e até 5 anos após o TCTH; dos níveis séricos de biomarcadores da DF (óxido nítrico, VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, endotelina) antes e até 5 anos após o transplante; dos níveis plasmáticos de biomarcadores da DECH (HGF, ST2, Reg3 α , IL2R α , IL-33, IL-15, IL-21, IL-22; APRIL, BAFF) antes e até 5 anos após o transplante; da frequência e do número absoluto de subpopulações linfoides e mieloides no sangue periférico antes e até 5 anos após o transplante; do número/porcentagem de células vermelhas maduras e reticulócitos; da concentração de hemoglobina total e HbS; da expressão de moléculas de adesão em eritrócitos e reticulócitos antes e até 5 anos após o transplante.

Inicialmente, essas análises foram feitas em um grupo que continha todos os pacientes com DF tratados com o TCTH alogênico, independente da resposta clínica ao tratamento, comparando cada período pós-transplante com o pré-transplante. Posteriormente, os pacientes foram retrospectivamente divididos em diferentes grupos de acordo com a resposta clínica após o transplante. Assim, foram avaliadas em todos períodos pós-transplante, as diferenças na reconstituição imunológica e hematológica entre os pacientes com DF que desenvolveram DECH aguda (DECHa) e não desenvolveram nenhuma forma da DECH (ausência DECH) e entre os pacientes que desenvolveram DECH crônica (DECHc) e não desenvolveram nenhuma forma da DECH (ausência DECH). De forma independente, também foi comparada a reconstituição imunológica e hematológica entre os pacientes com DF que perderam o enxerto (falha da enxertia) e que não perderam (enxertia). Além disso, em cada um desses grupos, as variáveis foram analisadas em cada período pós-transplante e comparadas ao período pré-transplante.

É importante ressaltar que coletas das amostras foram dependentes dos retornos dos pacientes ao hospital após o transplante. Assim, nem sempre as datas das coletas coincidem de forma exata com as datas programadas supracitadas e também nem todos os pacientes possuem amostras coletadas em todos os períodos citados anteriormente, sobretudo devido ao estado clínico do paciente ou ao não comparecimento do paciente aos retornos marcados. Um desenho esquemático do delineamento experimental pode ser visto no Apêndice A.

4 Casuística, Material e Métodos

4.1 Pacientes com doença falciforme e indivíduos sadios

Esse estudo trata-se de um estudo clínico prospectivo e longitudinal, no qual foram estudados pacientes com doença falciforme (N=40) submetidos ao tratamento com TCTH alogênico na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, segundo os critérios de inclusão e exclusão do protocolo clínico aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (3551/2002: "TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS EM HEMOGLOBINOPATIAS"; 2479/2015: "TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA EM ANEMIA FALCIFORME: IMPACTO DO PROCEDIMENTO SOBRE MARCADORES DA DOENÇA E QUALIDADE DE VIDA"). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

O regime de condicionamento foi mieloablativo e constituído de bussulfano (via endovenosa ou oral), fludarabina (via endovenosa) e ATG (via endovenosa) em 37 pacientes. A dose de fludarabina foi de 120 mg/kg dividida em 4 infusões entre os dias - 5 a -2, a dose de bussulfano variou de 12 a 16mg/kg (entre os dias -5 a -2) e a dose de ATG foi de 4,5mg em todos os pacientes (exceto um que recebeu 10mg/kg). Um paciente foi tratado com ciclofosfamida (200mg/kg; via endovenosa) ao invés de fludarabina. Dois pacientes receberam condicionamento não mieloablativo (um paciente recebeu bussulfano e ciclofosfamida e outro fludarabina e ciclofosfamida) devido à idade avançada em um (39 anos) e comorbidade (MoyaMoya extenso) em outro.

Os pacientes receberam TCTH alogênico de doador HLA-idêntico. Como profilaxia da DECH, os pacientes receberam metotrexato no D+1, D+3, D+6 e D+11 (15mg/m²; endovenoso) e ciclosporina A via endovenosa a partir de D-1 até a enxertia (3mg/kg/dia) e depois via oral (com a dose correspondente e de acordo com nível sérico) até 1 ano e meio pós-transplante.

A enxertia foi definida como base na reconstituição de neutrófilos e plaquetas. A "pega" de neutrófilos foi definida quando o número de neutrófilos atingiu pela primeira vez (e se manteve por 3 dias consecutivos pós-transplante) o valor maior ou igual a 0,5x10⁶ cells/uL. Já a "pega" de plaquetas foi definida quando o número de plaquetas atingiu pela primeira vez (e se manteve por 3 dias

consecutivos pós-transpante) o valor maior que 20×10^6 cells/uL sem transfusão por pelo menos 7 dias seguidos (Gluckman *et al.*, 2017). A falha da enxertia foi classificada baseada no estudo da hemoglobina S e quimerismo celular qualitativo. O desenvolvimento da DECH foi confirmado por biópsias, enquanto que a classificação da DECH aguda foi baseada no score de Glucksberg e a DECH crônica no critério do NIH (*National Institutes of Health*; 2005 e 2014) (Glucksberg *et al.*, 1974; Jagasia *et al.*, 2015).

As características clínicas e demográficas dos pacientes antes e após tratamento com TCTH, assim como dos doadores das células-tronco hematopoéticas, estão representados na Tabela 1 e Tabela 2.

Amostras de sangue periférico de 11 indivíduos sadios foram coletadas para comparações, sendo que amostras de 8 deles foram utilizadas para imunofenotipagem e análise de moléculas de adesão, amostras de 4 foram utilizadas para a dosagem de citocinas e 4 deles para análise de expressão gênica. Todos os indivíduos sadios assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Amostras de sangue periférico colhidas na presença de heparina sódica (14 UI/ml) foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade. As amostras foram diluídas 1:2 em tampão fosfato salina 1X (PBS), aplicadas cuidadosamente sobre o gradiente de Ficoll Hypaque ($d=1,077$, Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suécia) e centrifugadas a 500g por 30 minutos à temperatura ambiente (TA) para obtenção da camada de células mononucleares. As células presentes na interfase plasma-Ficoll Hypaque foram cuidadosamente coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1X. As células mononucleares separadas foram congeladas em solução de congelamento (1×10^7 células por 1,0 mL de solução de congelamento) - constituída de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, USA) + 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) - e armazenadas em N_2 líquido para posterior extração de DNA e/ou congeladas em TRIzol® Reagent (Invitrogen) em $-80^\circ C$ (1×10^7 células por 1,0 mL de TRIzol) para posterior extração de RNA.

4.3 Extração de DNA das células mononucleares do sangue periférico

A extração do DNA foi realizada pelo *DNeasy Blood & Tissue mini kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA). As células mononucleares dos pacientes foram descongeladas, adicionadas a 20 ml do meio de cultura RPMI e centrifugadas por 10 minutos a 200g à TA. O pellet de células mononucleares formado foi lavado com PBS 1X, ressuspenso em 200 μL PBS 1X e 20 μL de proteinase K foram adicionados

para degradação de proteínas. Posteriormente 200µL de *Buffer AL* foram adicionados e o conteúdo formado foi misturado no vórtex e incubado a 56°C. Após 10 minutos de incubação, 200 µL de ethanol (100%) foram adicionados e o conteúdo foi misturado novamente no vórtex. A suspensão celular foi pipetada em uma coluna (*DNeasy Mini spin column*) colocada em um tubo de coleta de 2 ml e centrifugado a 6000g por 1 minuto à TA. O tubo coletor e o conteúdo centrifugado foram descartados e a coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2 ml. Foram adicionados 500 µL de *Buffer AW1* à coluna e o conteúdo foi centrifugado por 1 minuto a 6000g à TA. Novamente o centrifugado e o tubo coletor foram descartados. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2ml, 500 µL de *Buffer AW2* foram adicionados e o conteúdo foi centrifugado por 3 minutos a 20,000g à TA para secar a membrana. A coluna foi transferida para um microtubo limpo (*RNA-free*) e 50 µL de *Buffer AE* foram pipetados diretamente na membrana para eluir o DNA. O material foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado por mais 1 minuto a 6000g à TA. Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, USA).

4.4 Análise de quimerismo das células nucleadas do sangue periférico

A análise de quimerismo de células nucleadas periféricas foi realizada por meio do sequenciamento de *short tandem repeats* (STR) e o gene da *Amelogenina*, usando o *PowerPlex Fusion Kit* (Promega, USA). Esse kit permite a amplificação de 23 STR (TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, FGA, D21S11, D5S818, D18S51, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, DYS391, Penta D, Penta E, D2S1338, CSF1PO, D19S433) e do gene da *Amelogenina* a partir do DNA genômico em uma única PCR (*polimerase chain reaction*). A reação foi processada em um termociclador por 1 minuto a 96°C, seguidos de 30 ciclos de 10 segundos a 94°C, 1 minuto a 59°C, 30 segundos a 72°C, 10 minutos a 60°C. Em seguida, 1µL de cada amostra amplificada foi misturada com 10µL de Hi-Di™ formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 1 µL de CC5 Internal Lane Standard 500 (Promega, USA), desnaturada por 3 minutos a 95°C e depois resfriada por 4 minutos a 4°C. Tais amostras foram submetidas à eletroforese em sequenciador automático de DNA (ABI 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystem) e a análise dos resultados foi feita pelo software *ChimerMarker* (Softgenetics, State College, PA, USA).

Um exemplo dos STR avaliado pode ser visto no Apêndice B

4.5 Extração de RNA a partir das células mononucleares do sangue periférico

A extração do RNA foi realizada utilizando o kit comercial *miRNeasy* (Qiagen, Valencia, CA, USA). As PBMC armazenadas em TRIzol foram incubadas por 5 minutos a TA, 140 µL de clorofórmio

foram adicionados à solução de células, a qual foi incubada por 3 minutos e centrifugada por 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase transparente (contendo o RNA) foi coletada e transferida para outro tubo *RNase-free*, onde foi adicionado 1,5x do volume da fase contendo o RNA de etanol 100%. Essa solução contendo o RNA foi transferida para uma *Spin Cartidge* (com o tubo coletor) e centrifugada a 12.000g por 15 segundos a TA. Em seguida, 700 µl do *Buffer RWT* foi adicionado e novamente a *Spin Cartidge* centrifugada por 8.000g por 15 segundos a TA. Após a centrifugação, 500 µL do *Buffer RPE* foi adicionado e centrifugado a 8.000g por 15 segundos a TA. Novamente, 500 µL do *Buffer RPE* foi adicionado e centrifugado a 8.000g por 2 minutos a TA. Para a eluição do microRNA, 30 µl de água *RNase-free* foi acrescentado e a *Spin Cartidge* centrifugada por 8.000g por 1 minuto a TA. Após a extração, as amostras de RNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, USA).

4.6 Validação da integridade e qualidade do RNA

O RNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, na presença de GelRed™ (Biotium), para determinação de sua qualidade e integridade. A eletroforese em gel de agarose foi realizada com corrente elétrica de 90 volts durante 40 minutos e então as bandas 28S, 18S e 5S do RNA ribossômico foram visualizadas em um transiluminador UV. Após a constatação da integridade e qualidade do RNA, este foi utilizado na síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa.

4.7 Transcrição reversa do RNA

O cDNA foi sintetizado a partir do kit comercial *RT² First Strand Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e utilizado para a análise da expressão gênica diferencial. Inicialmente, as amostras de RNA (quantidade inicial de 500 ng) foram incubadas com 2 µL do *Buffer GE* e água *nuclease-free* (q.s.p 10 µL) a 42°C por 5 minutos para a eliminação do DNA genômico e transferidas imediatamente para o gelo. Em seguida, para cada amostra de RNA, foram adicionados 4 µL do *Buffer BC3 (5x)*, 1 µL de *Control P2*, 2 µL do *RE3 Reverse Transcriptase Mix* e água 3 µL de água *nuclease-free*. A reação foi processada em termociclador por 15 minutos a 42°C e, em seguida, por 5 minutos a 95°C. Por fim, 91 µL água *nuclease-free* foram adicionados, completando o volume final de 111 µL.

4.8 RT² Profiler PCR array

Essa técnica permite a análise da expressão diferencial gênica utilizando a metodologia de PCR em tempo real, seguida da análise no Webportal

<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. Para cada amostra, foi feito um *mix* contendo 102 µL de cDNA, 1350µL de 2x *RT² SYBR Green Mastermix* e 1248 µL de água *nuclease-free*. Em seguida, foram distribuídos 25 µL do *mix* em cada poço de uma placa de 96 poços contendo *primers* específicos para 84 diferentes genes relacionados a inflamação e 8 genes endógenos (*PAHS – 077ZA RT2 Profiler PCR array Human Inflammatory Response & Autoimmunity*, *Quiagen*, Valencia, CA, USA):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BCL6	C3	C3AR1	CCL11	CCL13	CCL16	CCL17	CCL19	CCL2	CCL21	CCL22	CCL23
B	CCL24	CCL3	CCL4	CCL5	CCL7	CCL8	CCR1	CCR2	CCR3	CCR4	CCR7	CD14
C	CD40	CD40LG	CEBPB	CRP	CSF1	CXCL1	CXCL10	CXCL2	CXCL3	CXCL5	CXCL6	CXCL9
D	CXCR1	CXCR2	CXCR4	FASLG	FOS	IFNG	IL10	IL10RB	IL15	IL17A	IL18	IL1A
E	IL1B	IL1R1	IL1RAP	IL1RN	IL22	IL23A	IL23R	IL5	IL6	IL6R	IL8	IL9
F	ITGB2	KNG1	LTA	LTB	LY96	MYD88	NFKB1	NOS2	NR3C1	PTGS2	RIPK2	SELE
G	TIRAP	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR9	TNF	TNFSF14	TOLLIP
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

A reação foi processada no equipamento 7500 Real Time PCR system (*Applied Biosystems*) por 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Além disso, antes da realização da PCR em tempo real para cada amostra, a qualidade das mesmas foi avaliada. Para isso, foi realizada uma PCR em tempo real com o RNA e o cDNA, na qual vários controles foram testados (*RT2 RNA QC PCR array*, *Quiagen*). Foram validadas 12 amostras em cada placa controle:

cDNA	A1 HK1	2 HK1	3 HK1	4 HK1	5 HK1	6 HK1	7 HK1	8 HK1	9 HK1	10 HK1	11 HK1	12 HK1
	B HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2
	C RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC
	D PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC
	E GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC
RNA	F NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT
H2O	G PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC
	H NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

HK – Housekeeping gene; **RTC** – Reverse Transcription Control; **PPC** – Positive PCR Control; **GDC** – Genomic DNA Control; **NRT** – No Reverse Transcription Control; **NTC** – No Template Control

A reação também foi processada no equipamento 7500 Real Time PCR system (*Applied Biosystems*) por 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Foi estabelecido o mesmo *Ct* (*threshold cycle* = 0,1) para todas as placas e os dados analisados no Webportal <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>.

4.9 Dosagem de biomarcadores inflamatórios no plasma

A dosagem de 19 biomarcadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α e MIP-1 β) foi realizada utilizando o método de multiplex (Bio-Plex, Bio-Rad Laboratories Inc., Califórnia, EUA). Inicialmente, as proteínas de cada curva padrão (2 curvas padrão) foram reconstituídas em 250 μ L de *standard diluent*, homogeneizadas e incubadas por 30 minutos no gelo. Após a incubação, foram adicionados 64 μ L de cada curva padrão (total de 128 μ L) em 72 μ L de *standard diluent*, estabelecendo o ponto inicial da curva, a partir do qual foi realizada a diluição seriada (1:4). Em seguida, 15 μ L das amostras de plasma foram diluídas em 45 μ L de *sample diluent* (1:4). As micropartículas de captura (N=3) foram diluídas em *assay buffer* (575 μ L de cada micropartícula e 4025 μ L de diluente; volume final de 5750 μ L), os anticorpos biotinilados (N=3) foram diluídos em *detection antibody diluent* (300 μ L de cada anticorpo e 2100 μ L de diluente; volume final de 3000 μ L) e a estreptavidina-PE em *assay buffer* (60 μ L de estreptavidina e 5940 μ L de diluente; volume final de 6000 μ L).

Após o preparo dos reagentes, foram adicionados 50 µL de micropartículas de captura em cada poço de uma placa de 96 poços, a qual foi colocada em um magneto (permitindo que as micropartículas magnéticas ficassem presas) para a realização de duas lavagens com 100 µL de *wash buffer*. A placa foi retirada do magneto, os pontos da curva e as amostras (50 µL de cada) foram pipetados e a placa incubada por 30 minutos à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. A placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de *wash buffer*, 25 µL do anticorpo de detecção foram adicionados e novamente incubada por 30 minutos à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Mais uma vez, a placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de *wash buffer*, 50 µL de estreptavidina-PE foram adicionados e novamente incubada por 30 minutos à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Após mais 3 lavagens com 100 µL de *wash buffer*, 125 µL de *assay buffer* foram adicionados, a placa agitada por 30 segundos à 850 rpm e colocada no aparelho (Bio-Plex 200) para a leitura.

4.10 Dosagem de biomarcadores da DF e da DECH no plasma

A dosagem dos biomarcadores da DF (VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, endotelina) e da DECH (HGF, ST2, Reg3α, IL2Rα, IL-33, IL-15, IL-21, IL-22, APRIL, BAFF) foi feita utilizando a técnica de multiplex (Magnetic Luminex Assay, R&D System Inc., Minnesota, EUA). Inicialmente, as proteínas de cada curva padrão (9 curvas padrão: B, C, D, H, I, J, O, Q, R - lote L121427) foram reconstituídas em 250 µL de *calibrator diluent RD6-52* e incubadas por 15 minutos sob agitação leve. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de cada curva padrão e 100 µL de *calibrator diluent RD6-52* (volume final de 1000 µL), estabelecendo o ponto inicial da curva, a partir do qual foi realizada a diluição seriada (1:3). As micropartículas de captura foram diluídas em *diluent RD2-1* (500 µL de micropartícula e 5000 µL de diluente), os anticorpos biotinilados também foram diluídos em *diluent RD2-1* (500 µL de anticorpos e 5000 µL de diluente) e a estreptavidina-PE em *wash buffer* (220 µL de estreptavidina e 5035 µL de tampão). As amostras foram diluídas 2 vezes em *calibrator diluent RD6-52* (30 µL de amostra e 30 µL de tampão).

Em seguida, em uma placa de 96 poços, foram pipetados 50 µL das micropartículas, 50 µL da curva padrão ou 50 µL de cada amostra e a placa foi incubada por 2 horas à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incubação, a placa foi colocada em um magneto (permitindo que as micropartículas magnéticas ficassem presas) para a realização de 3 lavagens com 100 µL de *wash buffer*. A placa foi retirada do magneto, 50 µL de anticorpos biotinilados foram adicionados em cada poço e novamente a placa foi incubada por 1 hora à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. A placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de *wash buffer*, 50 µL de estreptavidina-PE foram

adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Por fim, a placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de *wash buffer*, 100 µL *wash buffer* foram adicionados em cada poço, a placa foi incubada por 2 minutos à 850 rpm e colocada no aparelho (Bio-Plex 200) para a leitura.

4.11 Dosagem de TGF- β no soro

A dosagem do TGF- β no soro dos pacientes foi realizada pelo método *CBA flex* (Cytometric Bead Array, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). Inicialmente, as amostras de soro foram submetidas à uma etapa de pré-ativação. Para isso, as amostras foram acidificadas com 50µL de HCl 1N e incubadas por 10 minutos à TA e depois neutralizadas com 50µL de NaOH/0,5M Hepes 1,2N. Em seguida, preparou-se a curva colocando em um tubo de 15mL a proteína liofilizada, que foi reconstituída em 4 mL de *assay diluent*, homogeneizada com uma pipeta, preparando assim, uma solução *top standard* (ponto inicial da curva 2.500 pg/mL da proteína). Essa solução *top standard* foi incubada por 15 minutos à TA e, posteriormente, as diluições da curva foram feitas a partir dela, constituindo os pontos 1:2 (1.250 pg/mL), 1:4 (625 pg/mL), 1:8 (312,5 pg/mL), 1:16 (156 pg/mL), 1:32 (80 pg/mL), 1:64 (40 pg/mL), 1:128 (20 pg/mL) e 1:256 (10 pg/mL). Após a curva, preparou-se a diluição da micropartícula de captura, em que 100 µL da micropartícula foram adicionados em um tubo de 15mL, completando o volume total de 5 mL com tampão *Capture Bead Diluent*. Após homogeneização, 50 µL da solução foram acrescidos de 50µL do soro dos pacientes e a preparação foi incubada por uma hora à TA, protegida da luz. Em seguida, 50µL da suspensão de *PE detection* foram adicionados e a preparação foi incubada por duas horas à TA e protegida da luz. Posteriormente, as micropartículas foram lavadas com 1mL de tampão de lavagem e centrifugadas a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o pellet ressuspenso em 100µL de *wash buffer*. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo e analisadas com o auxílio do software *FCAP array* (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA).

4.12 Dosagem indireta de óxido nítrico no soro

A determinação dos produtos do metabolismo do óxido nítrico (nitrito e nitrato) no soro foi feita por meio do ensaio colorimétrico baseado na reação de GREISS (Green et al., 1981). Para isso, 50µL de soro de cada paciente foram pipetados em uma placa de 96 poços. Em seguida, preparou-se uma curva, cujo primeiro ponto foi constituído de 50µL da solução de NO₂⁻ (200uM; Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e a partir do qual foi feita uma diluição seriada (1:2) com o meio de cultura RPMI-1. Por fim, 50µL da solução de Greiss (NEED 0,1% e SULFANILAMIDA 1%; Sigma-Aldrich, Steinhein,

Alemanha) foi adicionada em todos os poços da placa (amostras e curva), a qual ficou armazenada no escuro por 5 minutos para a posterior leitura no espectrofotômetro. A leitura das amostras foi feita no comprimento de onda de 554 nm.

4.13 Hemograma e cromatografia líquida de alta eficiência

A contagem das células vermelhas (células/ μ L) e a concentração da hemoglobina (g/dL) foram realizadas no analisador automático KX-21N (Sysmex America, Inc., EUA).

O diagnóstico da hemoglobina S foi realizado por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês *high performance liquid chromatography*, HPLC) utilizando o aparelho *Variant II* (Bio-Rad Laboratories Inc., Califórnia, EUA). Esse exame é um dos exames de rotina dos pacientes com DF atendidos no Hospital das Clínicas da FMRP-USP e foi realizado no Laboratório de Imunohematologia da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

4.14 Avaliação da frequência de reticulócitos e expressão de moléculas de adesão em células vermelhas

Para avaliar a frequência de reticulócitos e a expressão das moléculas de adesão CD36, CD47 e CD49d por citometria de fluxo, o sangue total foi centrifugado a 270 g por 3 minutos e o plasma descartado. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS à solução de células vermelhas que novamente foi centrifugada a 270 g por 3 minutos. O sobrenadante foi colhido e 2 mL de PBS adicionado novamente, repetindo 2 vezes o passo anterior. A solução de células vermelhas separada nesse processo de lavagens foi diluída 200 vezes (10 μ L solução de células vermelhas para 2mL de PBS e utilizada para as marcações).

Aliquotas de 100 μ L das hemácias diluídas foram incubadas por 15 minutos a TA no escuro com 5 μ L de anticorpos monoclonais ou isotipos controles. Em seguida, as hemácias foram lavadas 2 vezes com PBS, 1mL de Thiazole Orange (Sigma) adicionado (nos tubos controles foi adicionado PBS) e incubado por 30 minutos no escuro. A células foram então analisadas no citômetro de fluxo *FACSCalibur* (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). A contagem de reticulócitos foi feita a partir de 5 μ L do sangue total, ao qual foi adicionado 1mL de Thiazole Orange (no tubo controle foi adicionado 1 mL de PBS). O sangue ficou incubando por 30 minutos no escuro e foi analisado no citômetro. Os resultados foram dados em porcentagem: % de reticulócitos, % de células Thiazole+CD36+, Thiazole-CD36+, Thiazole+CD49d+, Thiazole-CD49d+, Thiazole-CD47+ e Thiazole+CD47+.

4.15 Imunofenotipagem de subpopulações celulares do sangue periférico

Amostras de 5 mL sangue periférico dos pacientes pré ou pós-TCTH foram coletadas na presença de EDTA (8.55 mg/tubo) para a realização de contagens hematológicas e imunofenotipagem por citometria de fluxo. As contagens hematológicas foram realizadas em contador de células automático (Coulter, Beckman Coulter Inc., Miami, USA) para obtenção do número absoluto de glóbulos brancos, linfócitos, monócitos e granulócitos. Aliquotas de 100 μ L de sangue periférico total foram incubadas por 15 minutos a TA no escuro com 5 μ L de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína piridina de clorofila (PercP) ou ficoeritrina-CY5 (PE-CY5), alofococianina (APC) adquiridos da Becton-Dickinson Biosciences (San Diego, CA, USA) e previamente titulados.

Foram feitas marcações duplas ou triplas para a análise das diversas subpopulações linfocitárias. Em seguida as amostras de sangue foram incubadas com 1 mL de solução de fixação e lise (FACs lysing solution, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) por 10 minutos a TA, para fixação das células e lise dos eritrócitos. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 500 g, lavadas duas vezes com tampão FACS (PBS, 0.2% de soro bovino fetal, 0.02% de azida sódica), ressuspensas em 150 μ L de tampão FACS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). Todas as incubações foram realizadas no escuro para evitar perda de fluorescência.

Para a realização da marcação de fator de transcrição FOXP3 no interior das células, após marcação de membrana citada anteriormente (por exemplo, anti-CD4 e anti-CD25, no caso das células T reguladoras), as células foram incubadas com 300 μ L de solução de permeabilização (*FACS permeabilizing solution*, BD, San Diego, CA, USA) por 10 minutos a TA. Após lavagem com tampão FACS, as células foram incubadas com 5 μ L de anticorpos monoclonais específicos ou isotipos controles intracelulares diretamente conjugados a fluorocromos por 30 minutos a TA. As células foram então lavadas novamente, ressuspensas em 150 μ L de tampão FACS e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). Controles isotípicos foram incluídos em todos os experimentos para determinação de reação inespecífica nas marcações extracelulares e/ou intracelulares.

As seguintes subpopulações linfocitárias foram analisadas: linfócitos T (CD3⁺), linfócitos T “helper” (CD3⁺CD4⁺), linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), linfócitos T auxiliares virgens, recém-imigrados do timo (CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺), linfócitos T *naive* (CD4⁺[CD8⁺]CD27⁺CD45RO⁻), linfócitos T de memória central (CD4⁺[CD8⁺]CD27⁺CD45RO⁺), linfócitos T de memória efetora (CD4⁺[CD8⁺]CD27⁻CD45RO⁺), linfócitos T efetores diferenciados (CD4⁺[CD8⁺]CD27⁻

CD45RO), linfócitos T exaustos (CD4+[CD8+]PD-1+), células T CD4 reguladoras (CD4+CD25hiFoxP3+), células T CD4 reguladoras expressando GITR (CD4+CD25hiGITR+), células T CD4 reguladoras ativadas (CD4+CD25hiFOXP3+CD69+), células T CD4 reguladoras expressando ectonucleotidases (CD4+CD25hiFOXP3+CD39+ e CD4+CD25hiFOXP3+CD73+), células T CD8 reguladora expressando CD57 (CD8+CD28-CD57+), células T CD8 reguladora (CD8+CD28-FoxP3+), NK (CD3-CD16+CD56+), iNKT (CD3+CD19- Vα24-Jα18 TCR+), linfócitos B (CD19), linfócitos B exaustos (CD19+PD-1+), linfócitos B *naïve* (CD19+IgD+CD38-), linfócitos B *naïve* ativados (CD19+IgD+CD38+), linfócitos B pré-centro germinativo (CD19+IgD+CD38hi), linfócitos B centroblastos/centrócitos (CD19+IgD-CD38hi), linfócitos B de memória recente (CD19+IgD-CD38+), linfócitos B de memória tardia (CD19+IgD-CD38-), células supressoras derivadas da linhagem mielóides granulocíticas (CD14-HLA-DR-CD11b+CD33+) e células supressoras derivadas da linhagem mielóides monocíticas (CD14+HLA-DR-CD11b+). Uma tabela com todas as populações celulares pode ser vista no Apêndice C.

Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Foram adquiridos 30.000 eventos/amostra nas marcações extracelulares e 100.000 eventos/amostra nas marcações intracelulares. As análises foram realizadas utilizando-se o software *Cellquest* (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e *FlowJo* (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). As células mortas foram excluídas por tamanho e granulosidade. Exemplos das *gates* utilizadas na análise estão nos Apêndice D-R.

4.16 Análise dos resultados

A análise diferencial da expressão gênica foi realizada *site* <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. Foi estabelecido Ct de 0,1 para todas as placas e para avaliar as diferenças na expressão dos genes foi determinado o valor 2 para o *fold regulation*.

Para as comparações de todas as variáveis (antes e após o transplante, entre os grupos nos diferentes períodos e entre indivíduos sadios e o pré-transplante) foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (mais de uma medida para um mesmo indivíduo) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (Schall, 1991). Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos têm distribuição normal com média 0 e variância σ^2 . Nas situações em que tal pressuposto não foi observado, transformações na variável resposta serão utilizadas. Para as comparações, foi utilizado o pós-teste por contrastes ortogonais, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes

quando p valor foi menor que 5% ($p < 0,05$). Esse procedimento foi realizado através do software SAS® 9.0 (SAS Institute Inc., SAS/STAT®, NC, USA), utilizando a PROC MIXED.

Resultados

5 Resultados

Parte I – Resposta clínica de pacientes com DF tratados com TCTH alogênico

5.1 Resposta clínica dos pacientes com DF tratados com TCTH alogênico

Foram estudados 40 pacientes com DF tratados com o TCTH (19 do sexo feminino e 21 do sexo masculino), cuja a média de idade foi de 19,1 anos. Embora a DF seja uma doença de maior prevalência em negros, 25 pacientes se autodeclararam brancos, 12 mulatos, 2 pardos e 1 negro. A maioria dos pacientes apresentou a forma mais severa da doença (HbSS; N=28), 10 apresentaram a forma associada à beta-talassemia (HbS/ β -tal), 2 apresentaram a forma associada à hemoglobina C (HbS/C). Treze pacientes faziam uso de HU antes do transplante, 7 faziam transfusão sanguínea simples, 6 faziam transfusão sanguínea de troca, 1 transfusão sanguínea simples e de troca e 9 faziam uso de HU e transfusão sanguínea (simples ou de troca) (Tabela 1).

Dentre os 40 pacientes tratados com o TCTH alogênico, 8 perderam o enxerto e apenas uma paciente (DF03) foi submetida novamente ao TCTH (Tabela 2). Houve pega da medula após o segundo transplante até cerca de 1 ano depois, quando a paciente faleceu devido a um extenso AVC hemorrágico (Moyamoya pré-existente). No primeiro transplante, a paciente DF03 foi tratada com o regime não mieloablativo (Flu+Cy), porém no segundo foi tratada com o regime mieloablativo, o mesmo utilizado nos outros pacientes (Bu+Flu+ATG). Exceto pela paciente DF39, todos os outros pacientes receberam uma ou mais infusões de linfócitos ou de células hematopoéticas (CD34+) pós-transplante dos seus respectivos doadores quando diagnosticada a falha da enxertia. A paciente DF15 recebeu infusão de células CD34+ 2 anos após o transplante, o paciente DF17 recebeu infusão de linfócitos em 4 doses (7, 8, 9 e 10 meses), o paciente DF19 recebeu infusão de células CD34+ ($4,97 \times 10^6$ células/kg) 1 ano e 4 meses, a paciente DF22 recebeu uma única dose de linfócitos 1 ano e 1 mês, o paciente DF28 recebeu duas infusões de linfócitos ($1,6 \times 10^6$ células/kg) em 1 ano e 11 meses e em 2 anos, e a paciente DF38 recebeu infusão de células CD34+ ($3,26 \times 10^6$ células/kg) 6 meses após o transplante. Duas pacientes que perderam o enxerto faleceram (DF15 e DF38), ambas por infecção.

Além da paciente DF03, apenas o paciente DF02 foi tratado com o regime de condicionamento não mieloablativo devido à idade (39 anos) (Tabela 2). Esse paciente começou a perder o enxerto 10 anos e 9 meses após o transplante, quando recebeu infusão de linfócitos do doador (dose única), recuperando o quimerismo celular.

Quatorze pacientes desenvolveram DECHa, porém apenas 1 apresentou grau III, todos os outros pacientes apresentaram DECHa até grau II. A maioria dos casos de DECHa foram de pele, 1

caso foi de pele e fígado, 1 de pele e trato gastrointestinal (TGI), 1 de fígado e 2 de TGI (Tabela 2). A paciente DF26 desenvolveu DECHa 1 ano e 6 meses após o TCTH; o paciente DF29 em 1 ano e 1 mês; os pacientes DF21 e DF36 em 2 meses; os pacientes DF19, DF38, DF20, DF40 e DF39 em 1 mês; a paciente DF07 desenvolveu DECHa em até 2 meses após o transplante (data exata não foi encontrada) e as datas exatas do diagnóstico da DECHa dos pacientes DF08 e DF10 não foram registradas.

Apenas 6 pacientes apresentaram DECHc limitada. Exceto em um caso (DF12), no qual não foram encontradas as informações sobre o local de acometimento, todos os outros foram de pele (Tabela 2). A paciente DF26 desenvolveu DECHc 1 ano e 6 meses após o TCTH, os pacientes DF12 e DF25 em 10 meses, a paciente DF38 em 6 meses, o paciente DF15 em 1 mês e a data do diagnóstico do paciente DF10 não foi encontrada. Em todos os casos de DECH (aguda ou crônica), os pacientes foram facilmente tratados com prednisona oral ou metilprednisona endovenosa (1mg/kg/dia).

Exceto o paciente DF10, todos os pacientes receberam as células tronco-hematopoéticas de doadores aparentados (irmãos HLA-idênticos; compatibilidade alélica 6/6 ou 8/8). Desses doadores, 21 eram traço falciforme, 13 não eram traço falciforme e 6 não tiveram os dados encontrados no sistema (Tabela 2). A fonte de células-tronco hematopoéticas foi a medula óssea na maioria dos casos, exceto nos transplantes dos pacientes AF05 e AF18, os quais receberam CTH mobilizadas para periferia.

Além da AF, o paciente DF10 possuía leucemia linfoblástica aguda e recebeu as células da medula óssea de um doador não aparentado. Um dado interessante é que esse paciente foi um dos que desenvolveu tanto DECH aguda quanto DECH crônica. Devido às singularidades clínicas, não foram feitas as análises laboratoriais do paciente DF10. Amostras dos pacientes DF01, DF03 e DF05 não foram armazenadas. A paciente DF06 perdeu o segmento e paciente DF35 não autorizou a coleta de sangue. Assim, esses 6 pacientes não foram avaliados pelas análises laboratoriais. Dos pacientes em que foram feitas as análises laboratoriais, 16 não tiveram DECH, 13 tiveram DECHa e 5 tiveram DECHc. Desses, 25 foram enxertados e 7 tiveram falha da enxertia.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com DF antes do TCTH.

(continua)

Número	Genótipo	Sexo/Idade na data do transplante	Etnia	Uso de HU antes do transplante	Transfusão sanguínea antes do transplante
DF01	HbSS	F/16	Mulata	Não	Simples
DF02	HbS/β0	M/39	Branco	Não	De troca
DF03	HbS/β0	F/13 e 15	Branca	Não	Simples
DF04	HbSS	M/27	Mulato	Sim	Não
DF05	HbSS	M/15	Branco	Sim	De troca
DF06	HbS/β0	F/35	Branca	Não	Simples
DF07	HbSS	F/9	Branca	Não	De troca
DF08	HbSS	M/20	Pardo	Sim	Não
DF09	HbS/β0	F/27	Branca	Sim	Não
DF10	HbSS	M/12	Branco	Não	De troca
DF11	HbSS	F/17	Branca	Sim	De troca
DF12	HbSS	F/14	Branca	Sim	Simples
DF13	HbSS	F/10	Branca	Não	De troca
DF14	HbS/β0	M/35	Mulato	Não	Simples
DF15	HbS/β0	F/31	Branca	Sim	Não
DF16	HbSS	M/24	Mulato	Sim	De troca
DF17	HbS/β0	M/13	Branco	Não	Simples
DF18	HbS/β0	F/30	Branca	Não	Simples
DF19	HbS/β0	M/24	Mulato	Sim	Não
DF20	HbS/HbC	M/7	Mulato	Sim	De troca
DF21	HbSS	M/18	Branco	Sim	De troca
DF22	HbSS	F/14	Branca	Sim	Não
DF23	HbSS	F/23	Mulata	Não	Simples
DF24	HbSS	F/19	Branca	Sim	Não
DF25	HbSS	M/14	Mulato	Sim	De troca
DF26	HbSS	F/10	Branca	*	*
DF27	HbSS	M/11	Mulato	Sim	De troca
DF28	HbSS	M/10	Branco	Não	De troca
DF29	HbSS	M/30	Mulato	Não	Não
DF30	HbS/HbC	M/26	Branco	Sim	Não
DF31	HbS/β0	M/16	Branco	Sim	Não
DF32	HbSS	M/12	Branco	Não	Não
DF33	HbSS	M/20	Mulato	Sim	Não

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com DF antes do TCTH.

(continuação)

Número	Genótipo	Sexo/Idade na data do transplante	Etnia	Uso de HU antes do transplante	Transfusão sanguínea antes do transplante
DF34	HbSS	M/7	Branco	Não	Não
DF35	HbSS	F/14	Mulata	Não	De troca
DF36	HbSS	F/33	Negra	Sim	Não
DF37	HbSS	M/12	Branco	Sim	Não
DF38	HbSS	F/32	Branca	Sim	Não
DF39	HbSS	F/13	Branca	Não	De troca e simples
DF40	HbSS	F/12	Parda	Sim	Simples

DF: doença falciforme; *Dados não encontrados.

Tabela 2 - Características clínicas dos doadores e dos pacientes após o TCTH.

(continua)

Número	Doador – Traço falciforme	Data do transplante	DECH aguda	DECH crônica	Enxertia	Óbito
DF01	*	24/01/2003	Não	Não	Sim	Não
DF02	*	18/05/2005	Não	Não	Sim	Não
DF03	*	08/07/2006 e 26/03/2009	Não	Não	Sim**	Sim
DF04	Sim	07/08/2008	Não	Não	Sim	Não
DF05	*	11/11/2009	Não	Não	Sim	Não
DF06	*	03/03/2010	Não	Não	Sim	Não
DF07	Sim	04/10/2010	Grau II (TGI)	Não	Sim	Não
DF08	Não	15/10/2010	Grau II (pele)	Não	Sim	Não
DF09	Sim	19/07/2011	Grau II (pele)	Não	Sim	Não
DF10	Não	24/04/2012	Grau II (pele)	Limitada (pele)	Sim	Não
DF11	Não	21/06/2012	Não	Não	Sim	Não
DF12	Não	05/02/2013	Não	Limitada	Sim	Não
DF13	Sim	15/03/2013	Não	Não	Sim	Não
DF14	Sim	12/04/2013	Não	Não	Sim	Não
DF15	Sim	02/07/2013	Não	Limitada (pele)	Falha da enxertia	Sim
DF16	Não	06/08/2013	Não	Não	Sim	Não
DF17	Não	27/11/2013	Não	Não	Falha da enxertia	Não
DF18	Sim	05/02/2014	Não	Não	Sim	Não
DF19	Não	19/03/2014	Grau II (pele e TGI)	Não	Falha da enxertia	Não
DF20	Sim	24/07/2014	Grau II (pele)	Não	Sim	Não
DF21	Sim	10/07/2014	Grau III (pele)	Não	Sim	Não
DF22	Sim	03/09/2014	Grau I/II (pele)	Não	Falha da enxertia	Não
DF23	Não	24/09/2014	Não	Não	Sim	Não
DF24	Sim	02/12/2014	Não	Não	Sim	Não
DF25	Não	13/11/2014	Não	Limitada (pele)	Sim	Não
DF26	Sim	30/01/2015	Grau I (pele) de sobreposição	Limitada (pele) de sobreposição	Sim	Não
DF27	Sim	01/04/2015	Não	Não	Sim	Não
DF28	Não	08/07/2015	Não	Não	Falha da enxertia	Não

Tabela 2 - Características clínicas dos doadores e dos pacientes após o TCTH.

(continuação)

Número	Doador – Traço falciforme	Data do transplante	DECH aguda	DECH crônica	Enxertia	Óbito
DF29	Sim	11/12/2015	Grau I (fígado)	Não	Sim	Não
DF30	Sim	25/11/2015	Não	Não	Sim	Não
DF31	Não	04/12/2015	Não	Não	Sim	Não
DF32	Sim	15/03/2016	Não	Não	Sim	Não
DF33	Sim	06/04/2016	Não	Não	Sim	Não
DF34	Sim	06/07/2016	Não	Não	Sim	Não
DF35	Não	01/09/2016	Não	Não	Sim	Não
DF36	Sim	13/07/2016	Grau I (TGI)	Não	Sim	Não
DF37	Sim	10/11/2016	Não	Não	Sim	Não
DF38	Não	19/01/2017	Grau I (pele e fígado)	Não	Sim	Sim
DF39	Sim	09/02/2017	Grau II (pele)	Não	Falha da enxertia	Não
DF40	*	12/04/2017	Grau II (pele) de sobreposição	Limitada (pele) de sobreposição	Falha da enxertia	Não

DF: doença falciforme; TGI: trato gastrointestinal; DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro. *Dados não encontrados. **Paciente teve enxertia somente após o segundo transplante.

5.2 Avaliação da enxertia nos pacientes com DF após o tratamento com o TCTH

O quimerismo celular nos pacientes com DF após o TCTH foi avaliado por meio do sequenciamento de 23 STR e do gene da Amelogenina nas células nucleadas dos pacientes (até 5 anos após o transplante) e de seus respectivos doadores. A porcentagem média de células de doadores foi 81,03% no primeiro mês após o transplante; 81,7% em 3 meses; 81,92% em 6 meses; 78,73% em 1 ano; 68,81% em 2 anos; 77,16% em 3 anos; 80,13% em 4 anos e 77,21% em 5 anos (Figura 1).

Figura 1 - Quimerismo celular em pacientes com DF após o TCTH.

Porcentagem de células dos doadores nos pacientes com DF após o transplante. A média está representada por +. 1 mo: 1 mês após o transplante; 3 mo: 3 meses após o transplante; 6 mo: 6 meses após o transplante; 12 mo: 12 meses após o transplante; 24 mo: 24 meses após o transplante; 36 mo: 36 meses após o transplante; 48 mo: 48 meses após o transplante; 60 mo: 60 meses após o transplante.

Fonte: próprio autor

Conforme esperado, a porcentagem de células do doador diminui nos pacientes que perderam o enxerto, como pode ser visto na Figura 2. Além disso, observamos que não houve diferença na porcentagem de células dos doadores quando comparado os pacientes que tiveram DECHa aos pacientes que não tiveram DECH (Figura 3), assim como diferenças não foram encontradas quando comparado os pacientes com DECHc comparado aos que não desenvolveram DECH (Figura 4).

Figura 2 - Porcentagem de células do doador em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Diferenças estatísticas entre os grupos estão representadas por # ($P < 0,05$). 1 mo: 1 mês após o transplante; 3 mo: 3 meses após o transplante; 6 mo: 6 meses após o transplante; 12 mo: 12 meses após o transplante; 24 mo: 24 meses após o transplante; 36 mo: 36 meses após o transplante; 48 mo: 48 meses após o transplante; 60 mo: 60 meses após o transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 3 - Porcentagem de células do doador em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Diferenças estatísticas entre o grupo que desenvolveu DECHa e não desenvolveu DECH estão representadas por # ($P < 0,05$). 1 mo: 1 mês após o transplante; 3 mo: 3 meses após o transplante; 6 mo: 6 meses após o transplante; 12 mo: 12 meses após o transplante; 24 mo: 24 meses após o transplante; 36 mo: 36 meses após o transplante; 48 mo: 48 meses após o transplante; 60 mo: 60 meses após o transplante. DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro.

Fonte: próprio autor

Figura 4 - Porcentagem de células do doador em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Diferenças estatísticas entre o grupo que desenvolveu DECHc e não desenvolveu DECH estão representadas por # ($P < 0,05$). 1 mo: 1 mês após o transplante; 3 mo: 3 meses após o transplante; 6 mo: 6 meses após o transplante; 12 mo: 12 meses após o transplante; 24 mo: 24 meses após o transplante; 36 mo: 36 meses após o transplante; 48 mo: 48 meses após o transplante; 60 mo: 60 meses após o transplante. DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro.

Fonte: próprio autor

5.3 Reconstituição hematológica e modulação de biomarcadores da DF nos pacientes com DF após tratamento com TCTH

Foi avaliada a reconstituição das células vermelhas, bem como a concentração de hemoglobina total, hemoglobina S e hematócrito antes e após o transplante. Também foi avaliada a expressão de moléculas de adesão CD36, CD47, CD49d (as quais estão envolvidas com a fisiopatologia da doença) na superfície das células vermelhas. Por fim, quantificamos os níveis de óxido nítrico, de moléculas de adesão solúveis, como VCAM-1, ICAM-1, P-selectina e da endotelina-1, os quais possuem concentração alterada nos pacientes com DF e foram denominados nesse trabalho como biomarcadores da DF. Inicialmente, fizemos a análise global desses parâmetros em todos os pacientes antes e após o transplante e, em seguida, avaliamos os pacientes separadamente, comparando o grupo de pacientes que perdeu o enxerto com o que não perdeu o enxerto.

5.3.1 Avaliação global da reconstituição de células vermelhas em pacientes com DF após o TCTH alogênico

Observamos redução do número de células vermelhas (Figura 5A), da concentração de hemoglobina total (Figura 5B) e do hematócrito (Figura 5C) nos pacientes com DF antes do transplante comparado aos indivíduos saudáveis. A partir de um mês pós-transplante, foi visto o aumento do número das células vermelhas comparado ao pré-transplante (Figura 5A), assim como o aumento da hemoglobina total a partir de 3 meses (Figura 5B) e do hematócrito a partir de 6 meses após o transplante (Figura 5C). Além disso, a porcentagem de hemoglobina S diminuiu 1 mês após o transplante (Figura 6), assim como a porcentagem de reticulócitos, a qual estava aumentada nos pacientes antes do transplante (comparado aos indivíduos saudáveis) (Figura 7).

Figura 5 - Reconstituição de células vermelhas em pacientes com DF tratados com TCTH.

(A) número de hemácias, (B) concentração de hemoglobina total e (C) hematócrito. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 6 - Porcentagem de hemoglobina S em pacientes com DF tratados com TCTH.

Porcentagem de hemoglobina S. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$). A média está representada por +. Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 7 - Frequência de reticulócitos em pacientes com DF tratados com TCTH.

Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Avaliamos também a expressão das moléculas de adesão tanto em células vermelhas maduras (Thiazole Orange negativas) como em reticulócitos (Thiazole Orange positivos). Comparado ao pré-transplante, a frequência de células vermelhas maduras expressando a molécula CD47 foi maior até 5 anos após o transplante, enquanto a frequência de reticulócitos expressando CD47 foi menor (Figura 8). Além disso, quando comparado aos indivíduos saudáveis, os pacientes com DF apresentaram maior frequência de reticulócitos CD47+ (Figura 8B). A frequência de células vermelhas maduras expressando CD36 diminuiu 48 meses após o transplante comparado ao pré-transplante. Por outro lado, a frequência de reticulócitos expressando CD36 diminuiu em 24 e 48 meses após o TCTH (Figura 9). Não foi vista alteração na expressão de CD49d em células vermelhas, ao passo que houve redução da frequência de reticulócitos CD49d+ 3 meses após o transplante (Figura 10). Além disso, a frequência de reticulócitos expressando CD49d foi maior nos pacientes com DF antes do transplante comparado aos indivíduos saudáveis (Figura 10B).

Figura 8 – Frequência de células vermelhas expressando CD47 em pacientes com DF tratados com TCTH.

(A) *Thiazole Orange*-CD47⁺ e (B) *Thiazole Orange*+CD47⁺. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 9 - Frequência de células vermelhas expressando CD36 em pacientes com DF tratados com TCTH.

(A) *Thiazole Orange*-CD36⁺ e (B) *Thiazole Orange*+CD36⁺. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 10 – Frequência de células vermelhas expressando CD49d em pacientes com DF tratados com TCTH.

(A) *Thiazole Orange*-CD49d⁺ e (B) *Thiazole Orange*+CD49d⁺. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** (P<0,05). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante. Fonte: próprio autor

No que se refere aos biomarcadores da DF, não observamos diferença na concentração de nitrito (medida indireta do óxido nítrico) quando comparamos indivíduos saudáveis com os pacientes com DF no pré-transplante. Comparado ao pré-transplante, a concentração de nitrito aumentou 3 meses após o TCTH (Figura 11).

Figura 11 - Concentração de nitrito no soro de pacientes com DF tratados com TCTH.

A concentração de nitrito no soro de pacientes antes e após o transplante e em indivíduos saudáveis foi avaliada utilizando a reação de Griess. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** (P<0,05). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante. Fonte: próprio autor

Da mesma forma, não observamos diferenças entre a concentração de P-selectina em indivíduos sadios e pacientes com DF. Houve diminuição dos níveis de P-selectina em relação ao pré-transplante em 1 mês após TCTH (Figura 12A). Por outro lado, a concentração de ICAM-1 foi diminuída em pacientes com DF comparado aos indivíduos sadios e aumentou em 1 e 6 meses após o transplante em relação ao pré-TCTH (Figura 12B). Da mesma forma, a concentração de VCAM-1 foi maior nos pacientes com DF comparado aos indivíduos sadios e diminuiu a partir de 3 meses após o transplante (Figura 12C).

Os níveis de endotelina-1 não foram detectados no ensaio de multiplex, não sendo possível analisá-la pelo método estatístico proposto. Os dados referentes a dosagem da endotelina-1 podem ser vistos no Apêndice S.

Figura 12 - Moléculas de adesão no plasma de pacientes com DF tratados com o TCTH.

Concentração em pg/mL de (A) P-selectina, (B) ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) e (C) VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular 1) em pacientes com DF antes e após o transplante e em indivíduos sadios. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos sadios e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos sadios; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

5.3.2 Comparação entre os grupos “falha da enxertia” e “enxertia”

Quando avaliado separadamente os pacientes que perderam e não perderam o enxerto, observamos que o aumento das células vermelhas (Figura 13A), da hemoglobina total (Figura 13B) e do hematócrito (Figura 13C) após o transplante ocorreu somente nos pacientes que não perderam o enxerto. Quando comparado os dois grupos, diferenças no número de células vermelhas, na concentração da hemoglobina total e no hematócrito foram significativas em 6 e 24 meses após o transplante (Figura 13A, Figura 13B e Figura 13C).

Figura 13 - Avaliação das células vermelhas em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após TCTH

(A) número de hemácias, (B) hematócrito e (C) concentração de hemoglobina total. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

A hemoglobina S diminuiu nos dois grupos, porém no grupo que perdeu o enxerto a diminuição foi vista somente entre 3 e 12 meses após o transplante, enquanto no grupo que não perdeu ela ocorreu até 2 anos ou mais após o transplante (Figura 14).

Figura 14 – Porcentagem de hemoglobina S em pacientes que perderam e não perderam o enxerto após TCTH.

Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre os grupos por # ($P<0,05$). Pre: período pré-transplante.
Fonte: próprio autor

A frequência de reticulócitos diminuiu significativamente até um 1 pós-TCTH nos pacientes que perderam o enxerto, aumentando a partir desse período, enquanto foi reduzida até 5 anos nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 15). Quando comparada entre os grupos, a frequência dos reticulócitos foi maior nos pacientes que perderam o enxerto em 24 e 36 meses após o transplante (Figura 15).

Figura 15 - Frequência de reticulócitos em pacientes DF que perderam e não perderam o enxerto após TCTH.

Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

A expressão das moléculas de adesão também foi avaliada nos dois grupos. O aumento de células vermelhas expressando CD47 ocorreu somente até 6 meses nos pacientes que perderam o enxerto e até 5 anos nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 16A). Maior frequência de células vermelhas maduras CD47+ foi observada em 12 e 36 meses nos pacientes que não perderam o enxerto comparado ao grupo de pacientes que perdeu o enxerto (Figura 16A). A frequência de reticulócitos expressando CD47 também foi menor até 5 anos nos pacientes que não perderam o enxerto comparado ao pré-TCTH, enquanto nos pacientes que perderam o enxerto essa diminuição ocorreu até 6 meses após o transplante (Figura 16B). Diferenças entre os grupos foram observadas no período pré-transplante, 24 e 36 meses após o transplante (Figura 16B).

Figura 16 - Frequência de células vermelhas expressando CD47 em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após TCTH.

(A) Thiazole Orange-CD47+ e (B) Thiazole Orange+CD47+. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre os grupos por # ($P<0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

A frequência de células vermelhas expressando CD36 ou CD49d aumentou 36 meses após o transplante nos pacientes que perderam o enxerto comparado aos que não perderam (Figura 17A e Figura 18A) e os reticulócitos expressando CD36 ou CD49d também aumentaram 24 e 36 meses após o TCTH nos pacientes que perderam o enxerto comparado aos que não perderam (Figura 17B e Figura 18B).

Figura 17 - Frequência de células vermelhas expressando CD36 em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após TCTH.

(A) Thiazole Orange-CD36+ e (B) Thiazole Orange+CD36+. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre os grupos por # ($P<0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 18 - Frequência de células vermelhas expressando CD49d em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após TCTH.

(A) Thiazole Orange-CD49d+ e (B) Thiazole Orange+CD49d+. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre os grupos por # ($P<0,05$). Pre: período pré-transplante.
Fonte: próprio autor

Por fim, quando quantificamos a concentração de nitrito nos dois grupos de pacientes, observamos que o aumento de nitrito no terceiro mês após o transplante foi visto somente no grupo de pacientes que não perdeu o enxerto (Figura 19).

Figura 19 - Concentração de nitrito no soro de pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

A concentração de nitrito no soro de pacientes antes e após o transplante foi avaliada utilizando a reação de Griess. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre os grupos por # ($P<0,05$). Pre: período pré-transplante.
Fonte: próprio autor

Em relação as moléculas de adesão solúveis, a concentração de P-selectina diminuiu 1 mês após o transplante (comparado ao pré-TCTH) somente nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 20A). Os níveis de ICAM-1 aumentaram 1 e 6 meses após o transplante somente no grupo de pacientes que não perderam o enxerto (Figura 20B). A concentração de VCAM-1 reduziu entre 3-6 meses após o TCTH nos pacientes que perderam o enxerto e se manteve reduzida até 5 anos após o transplante (comparado ao pré-TCTH) nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 20C).

Figura 20 - Concentração plasmática das moléculas de adesão solúveis P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 de pacientes com DF tratados com TCTH.

Concentração de (A) P-selectina, (B) ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) e (C) VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular 1) em pacientes com DF antes e após o transplante. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

5.4 Expressão diferencial de genes envolvidos com a resposta inflamatória em pacientes com DF tratados com TCTH.

Em nosso trabalho, nós também investigamos o papel do transplante na modulação da resposta inflamatória característica de pacientes com DF. Nesse sentido, avaliamos a expressão de 84 genes envolvidos com o processo inflamatório em PBMC de 4 pacientes com DF antes e até 1 ano após o transplante. Quantificamos também os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias presente no soro de pacientes com DF antes e até 5 anos após o transplante. Os pacientes avaliados nos experimentos de expressão gênica foram o DF21, DF24, DF27 e DF28. O paciente DF21 teve DECHa 2 meses após o transplante, porém foi facilmente controlado (Tabela 2). O paciente DF28 perdeu o enxerto após a análise de expressão gênica (2 anos após o TCTH) (Tabela 2).

Primeiramente, observamos o aumento da expressão de vários genes inflamatórios em pacientes com DF antes do transplante comparado com os indivíduos saudáveis (Figura 21), por exemplo das quimiocinas CCL2, CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8; dos receptores das quimiocinas MIP-1 α , MCP-3, CCL5 (CCR1), IL-8 (CXCR1) e da IL-1 (Figura 21). Além desses, a expressão dos genes do TOLLIP (proteína de interação Toll) e TNFSF14 (do inglês *tumor necrosis factor ligand superfamily member 14*) foram *up* regulados nos pacientes com DF comparados aos indivíduos saudáveis.

Por outro lado, encontramos diminuição da expressão de genes das quimiocinas CCL11, CCL16, CCL21, CCL8, do gene da IL-5 e do gene do receptor CCR3 nos pacientes com DF antes do transplante, em comparação com o grupo controle.

Além disso, a expressão do gene da enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2) foi diminuída nos pacientes com DF (Figura 21), bem como dos genes que codificam CCL4, CCL5, L-17A, IL-15, IFN- γ CXCL9, CXCL10 e a proteína C reativa.

Figura 21 - Genes *up* e *down* regulados nos pacientes com DF antes do transplante comparado aos indivíduos saudáveis.

Amostras de RNA dos pacientes com DF antes do transplante (N=4) e de indivíduos saudáveis (N=4) foram isoladas, o cDNA sintetizado e a expressão gênica avaliada por PCR array.

Fonte: próprio autor

Também comparamos a expressão desses 84 genes relacionados a inflamação nos diversos períodos pós-transplante com o pré-transplante (Figura 22, Figura 23, Figura 24 e Figura 25). Já no primeiro mês após o transplante (Figura 22), observamos que a expressão dos genes das quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, CCL2 e CCL7 foi diminuída quando comparado ao pré-transplante. Interessantemente, todos esses genes estavam *up* regulados nos pacientes pré-transplante quando comparados aos indivíduos saudáveis. Outros genes que codificam proteínas pró-inflamatórias também foram *down* regulados nesse período, como os genes que codificam CCR4, CXCL6, IL-1A, IL-6, CD40, CD14, FOS, LTA (linfotóxina alfa) e PTGS2 (prostaglandina endoperoxídeo sintase 2) (Figura 22).

Figura 22 – Genes *up* e *down* regulados nos pacientes com DF um mês após o transplante comparado ao pré-transplante.

Amostras de RNA dos pacientes com DF antes do transplante (N=4) e após o transplante (N=4) foram isoladas, o cDNA sintetizado e a expressão gênica avaliada por PCR *array*.

Fonte: próprio autor

Três meses após o transplante, poucas alterações foram observadas na expressão gênica quando comparado com o pré-transplante (Figura 23). Seis meses após o transplante, observamos que a expressão dos genes de várias quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, CCL22, CCL24), receptores de quimiocinas (CXCR2, CXCR4), assim como de IL-10, FOS, IL1R1 e PTGS2, encontra-se diminuída quando comparado ao pré-transplante. Contudo, observamos o aumento da expressão de outras quimiocinas, como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 (Figura 24).

Figura 23 - Genes *up* e *down* regulados nos pacientes com DF três meses após o transplante comparado ao pré-transplante.

Amostras de RNA dos pacientes com DF antes do transplante (N=4) e após o transplante (N=4) foram isoladas, o cDNA sintetizado e a expressão gênica avaliada por PCR array.

Fonte: próprio autor

Figura 24 - Genes *up* e *down* regulados nos pacientes com DF seis meses após o transplante comparado ao pré-transplante.

Amostras de RNA dos pacientes com DF antes do transplante (N=4) e após o transplante (N=4) foram isoladas, o cDNA sintetizado e a expressão gênica avaliada por PCR array.

Fonte: próprio autor

Um ano após o TCTH alogênico, observamos o aumento da expressão de genes de algumas quimiocinas (CCL4, CCL5 e CCL16) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF e IFN- γ), porém a expressão de genes que codificam FOS, IL1R1, TLR9 (receptor do tipo Toll 9) estava diminuída. Além disso, a expressão dos genes das quimiocinas CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8 manteve-se diminuída em comparação ao pré-transplante. O gene da NOS2, que estava *down* regulado nos pacientes com DF quando comparado ao grupo controle, foi *up* regulado nesse período em comparação ao pré-transplante (Figura 25).

Figura 25 - Genes *up* e *down* regulados nos pacientes com DF um ano após o transplante comparado ao pré-transplante.

Amostras de RNA dos pacientes com DF antes do transplante (N=4) e após o transplante (N=4) foram isoladas, o cDNA sintetizado e a expressão gênica avaliada por PCR *array*.

Fonte: próprio autor

A análise de agrupamento gênico demonstrou modulação no perfil de expressão dos 84 genes avaliados nos pacientes com DF após o TACTH alogênico. A assinatura de expressão gênica dos 84 genes 1 ano após o transplante clusterizou junto com assinatura de expressão gênica dos indivíduos saudáveis (Figura 26).

Figura 26 - Agrupamento de pacientes com DF tratados com o TCTH e indivíduos saudáveis baseado na expressão diferencial gênica.

Control group: indivíduos saudáveis; **Group 1:** pré-transplante; **Group 2:** um mês pós-transplante; **Group 3:** três meses pós-transplante; **Group 4:** seis meses pós-transplante; **Group 5:** um ano pós-transplante. Fonte: próprio autor

Além da expressão de genes inflamatórios, foi realizada a dosagem das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), IFN- γ (interferon gama), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e das quimiocinas MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1; também chamada de CCL2), MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa; também chamada de CCL3) e MIP-1 β (proteína inflamatória de macrófagos 1 beta; também chamada de CCL4) no plasma desses pacientes. Contudo, muitas citocinas avaliadas não foram detectadas e assim não foi possível analisá-las pelo método estatístico proposto. Somente as citocinas IL-18, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α e MIP-1 β foram analisadas (Figura 27 - Figura 30). Dados referentes às citocinas não analisadas estatisticamente podem ser vistos no Apêndice S.

Os níveis plasmáticos das citocinas IL-18, TNF- α e MIP-1 α foram aumentados nos pacientes com DF no pré-transplante comparado aos indivíduos saudáveis (Figura 27A e Figura 27B; Figura 28A). A concentração de IL-18 e MIP-1 α diminuiu significativamente até 5 anos após o TCTH comparada ao período pré-transplante (Figura 27A e Figura 28A). A concentração de TNF- α foi menor 36 meses após o transplante que no pré-TCTH (Figura 27B). Comparado ao pré-TCTH, a concentração de MIP-1 β diminuiu até 6 meses após o transplante, aumentando em 1 ano após o transplante (Figura 28B). O nível plasmático de MCP-1 aumentou 1 mês após o TCTH e, após esse período, atingiu níveis do pré-transplante (Figura 28C).

Figura 27 - Níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com DF tratados com o TCTH.

Concentração em pg/mL de **(A)** IL-18 e **(B)** TNF- α no plasma. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante
Fonte: próprio autor

Figura 28. Níveis plasmáticos de quimiocinas inflamatórias em pacientes com DF tratados com TCTH.

Concentração em pg/mL de (A) MIP-1 α , (B) MIP-1 β e (C) MCP-1 no plasma. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos sadios e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos sadios; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Quando dividimos os pacientes de acordo com a falha da enxertia, observamos que a redução da concentração de IL-18 e MIP-1 α no soro após o transplante ocorreu no grupo de pacientes que não perderam o enxerto, com o aumento significativo dessas citocinas em 24 meses após o TCTH nos pacientes que perderam o enxerto (comparado com o grupo que não perdeu) (Figura 29A e Figura 30A). A concentração de TNF- α aumentou 36 meses após o TCTH nos pacientes que perderam o enxerto comparado aos que não perderam (Figura 29 B). A diminuição da concentração de MIP-1 β 6 meses após o transplante, seguido do aumento em 12 meses, também foi observada somente nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 30B). A concentração de MCP-1 foi menor nos pacientes que perderam o enxerto 3 meses após o TCTH (Figura 30C).

Figura 29. Níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após TCTH.

Concentração em pg/mL de **(A)** IL-18 e **(B)** TNF- α no plasma. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 30. Níveis plasmáticos de quimiocinas inflamatórias em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após TCTH.

Concentração em pg/mL de (A) MIP-1 α , (B) MIP-1 β e (C) MCP-1 no plasma. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Parte II – Perfis de reconstituição imunológica de pacientes com DF tratados com TCTH alogênico

5.5 Reconstituição imunológica de pacientes com DF após o TCTH

Primeiramente avaliamos o perfil de reconstituição imunológica do grupo total de pacientes tratados com o TCTH alogênico, comparando números absolutos e/ou frequência de diferentes subpopulações do sistema imunológico em diversos períodos pós-transplante com o período pré-transplante. Além disso, comparamos essas mesmas subpopulações nos pacientes pré-transplante com indivíduos saudáveis.

Inicialmente, avaliamos a reconstituição de leucócitos, neutrófilos e linfócitos totais (Figura 31). Observamos aumento do número de leucócitos nos pacientes com DF no pré-transplante comparado aos indivíduos saudáveis (Figura 31A). O número de leucócitos permaneceu reduzido até 1 ano após o transplante comparado ao pré-transplante (Figura 31A). Houve redução dos neutrófilos durante os 3 primeiros meses (Figura 31A) e de linfócitos totais até 12 meses após o transplante (Figura 31C). Em 24 meses após o TCTH, foi observado aumento do número de linfócitos comparado ao pré-transplante (Figura 31C).

Figura 31 – Números absolutos de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de (A) leucócitos totais, (B) neutrófilos e (C) linfócitos. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Em seguida, o número absoluto de linfócitos T e B foi avaliado. Foi observada a redução no número dessas células até 3 meses após o TCTH (Figura 32). Especificamente, o número de linfócitos T CD4⁺ diminuiu até 6 meses (Figura 33A) e o de linfócitos T CD8⁺ reduziu até 3 meses (Figura 33B), resultando na inversão da razão CD4/CD8 normal até 36 meses (Figura 33C). Interessantemente, o número de células T CD4⁺ recém emigrantes do timo (RTE, do inglês *recent thymic emigrant*) também foi menor nos pacientes com DF comparado aos indivíduos saudáveis (Figura 34). O número de RET também foi reduzido durante os 6 primeiros meses após o transplante, apresentando aumento significativo em 24 e 60 meses, em comparação ao pré-TCTH (Figura 34).

Figura 32 - Números absolutos de linfócitos T e B em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T e (B) linfócitos B. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 33 - Números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos TCD4+, (B) linfócitos TCD8+ e (C) razão CD4/CD8. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 34 - Números absolutos de linfócitos T recém emigrantes do timo em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de células CD3+CD4+CD45RA+CD31+ (RTE). Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos sadios e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos sadios; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

O número de linfócitos T CD4+ *naive* diminuiu até 6 meses (Figura 35A) e o número de linfócitos T CD4+ de memória central diminuiu até 3 meses após o TCTH (Figura 35D). O número de linfócitos T CD4+ efetores aumentou em 6 e 24 meses (Figura 35B) e de linfócitos T CD4+ de memória efetora (Figura 35C) em 24 e 60 meses após o transplante. Além disso, o número de linfócitos T CD4+ *naive* e efetores foi menor nos pacientes com DF no pré-transplante que em indivíduos sadios (Figura 35).

Figura 35 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD4+ em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+ *naive*, (B) linfócitos T CD4+ efetoras, (C) linfócitos T CD4+ de memória efetora e (D) linfócitos T CD4+ de memória central. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

O número de linfócitos T CD8+ *naive* também diminuiu até 3 meses após o transplante (Figura 36A). Houve redução de linfócitos T CD8+ efetores 1 mês após o TCTH, a qual foi seguida do aumento do número dessas células até 36 meses comparado ao pré-transplante (Figura 36B). O número de linfócitos T CD8+ de memória efetora aumentou em 12, 24, 36 e 60 meses após o transplante (Figura 36C), enquanto não foram observadas alterações nos linfócitos T CD8+ de memória central (Figura 36D).

Figura 36 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD8+ em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD8+ *naive*, (B) linfócitos T CD8+ efetoras, (C) linfócitos T CD8+ de memória efetora e (D) linfócitos T CD8+ de memória central. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

O número de células B *naive* também diminuiu nos primeiros 3 meses, recuperou valores normais 6 meses pós-TCTH e aumentou 2 anos após o transplante (Figura 37A). Já o número das células B *naive* ativadas diminuiu 1 mês após o transplante e aumentou 2 e 3 anos quando comparado ao pré-transplante (Figura 37B). As células B pré-centro germinativo diminuíram 1 mês e aumentaram 60 meses após o transplante (Figura 37C), os centroblastos/centrócitos diminuíram até 3 meses e aumentaram 5 anos após o TCTH (Figura 37D). As células B de memória recente tiveram seu número reduzido até 12 meses após o TCTH, aumentando significativamente em 60 meses (Figura 37E), enquanto o número das células B de memória tardia reduziu até 6 meses após o transplante (Figura 37F).

Figura 37- Números absolutos de subpopulações de linfócitos B em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de (A) linfócito B *naïve*, (B) linfócito B *naïve* ativado, (C) linfócito B pré-centro germinativo, (D) centroblasto/centrócito, (E) linfócito B de memória recente e (F) linfócito B de memória tardia. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Com base na importância da molécula PD-1 (proteína de morte celular programada 1) e do seu ligante PDL-1 (ligante da proteína de morte celular programada 1) no controle da resposta imunológica após o transplante de células-tronco hematopoéticas, nós avaliamos a expressão de PD-1 em linfócitos T e B (Figura 38). Foi observada a redução de células T CD4+PD-1+ (Figura 38A) e de células T CD8+PD-1+ (Figura 38B) em 1 mês após o transplante, além do aumento das células T CD4+

expressando PD-1 cinco anos após o transplante (Figura 38A). O número de células B expressando PD-1 aumentou 12, 24 e 60 meses após o transplante (Figura 38C).

Figura 38 - Números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B expressando PD-1 em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+PD-1+, (B) linfócitos T CD8+PD-1+ e (C) linfócitos B PD-1+. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Além disso, avaliamos a reconstituição de diversas células de perfil regulador, tanto T CD4+ reguladoras, quanto células T CD8+ reguladoras (Figura 39-Figura 43). Foi visto o aumento das células T CD4+CD25hi expressando GITR (receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide) de 6 até 36 meses após o transplante (Figura 39A), enquanto o número das células T reguladoras Foxp3+ foi reduzido até 6 meses após o transplante, atingindo valores semelhantes ao pré-transplante a partir desse período (Figura 39B). Interessantemente, a concentração sérica de TGF- β diminuiu nesse mesmo período pós-transplante (Figura 40).

Figura 39 - Números absolutos de subpopulações de células T CD4⁺ reguladoras em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4⁺CD25^{hi}GITR⁺ e (B) linfócitos T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** (P<0,05). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 40 - Níveis séricos de TGF- β em pacientes com DF tratados com o TCTH.

Concentração em pg/mL de TGF- β . Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** (P<0,05). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Também avaliamos o número absoluto de células T reguladoras Foxp3⁺ ativadas (expressando o CD69) e de células T reguladoras Foxp3⁺ expressando as ectonucleotidases CD39 e CD73 em sua superfície. Contudo, não observamos alteração no número absoluto dessas células após o TCTH, quando comparado ao pré-transplante (Figura 41 e Figura 42).

Figura 41 - Números absolutos de subpopulações de células TCD4+ reguladoras ativadas em pacientes com DF tratados com TCTH.

Número absoluto de T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺CD69⁺. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** (P<0,05). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.
Fonte: próprio autor

Figura 42 - Números absolutos de subpopulações de células TCD4+ reguladoras expressando ectonucleotidases em pacientes com DF tratados com o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺CD39⁺ e (B) linfócitos T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺CD73⁺. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** (P<0,05). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.
Fonte: próprio autor

Ademais, comparado ao pré-transplante, foi observado aumento do número de células T CD8⁺CD28⁺CD57⁺ a partir de 6 meses até 60 meses após o transplante (Figura 43A), enquanto o número de células T CD8⁺CD28⁺Foxp3⁺ aumentou no período 12-24 meses após o transplante (Figura 43B).

Figura 43 - Números absolutos de subpopulações de células T CD8+ reguladoras em pacientes com DF tratados com o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD8+CD28-CD57+ e (B) linfócitos T CD8+CD28-Foxp3+. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Além de subpopulações de células T de perfil regulador, também avaliamos a reconstituição das células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSC) (Figura 44). Em nosso trabalho, foi demonstrado o aumento da frequência das MDSC monocíticas 1 mês após o transplante (Figura 44A), ao passo que não foi vista alteração na frequência da MDSC granulocíticas após o transplante (Figura 44B).

Figura 44 – Frequência de células supressoras derivadas da linhagem mieloide em pacientes com DF tratados com TCTH.

Frequência de células supressoras derivadas da linhagem mieloide (A) monocíticas e (B) granulocíticas. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Por fim, foi investigada a reconstituição das células NK e iNKT (células T matadoras naturais invariáveis) (Figura 45). O número das células NK aumentou 4 e 5 anos após o transplante (Figura 45A) e das células iNKT aumentou 3 anos após o transplante (Figura 45B).

Figura 45 - Células NK e iNKT em pacientes com DF tratados com o TCTH.

Número absoluto de (A) células NK e (B) células iNKT. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos sadios e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos sadios; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Além da avaliação de subpopulações celulares periféricas, nós também avaliamos a concentração de proteínas plasmáticas envolvidas com a resposta imunológica, sendo algumas consideradas biomarcadores da DECH (IL2R α /CD25, ST2, Reg3 α e HGF).

Observamos aumento de IL2R α /CD25 (subunidade alfa do receptor da IL-2) até 24 meses após o transplante comparado ao pré-transplante (Figura 46A) e aumento de Reg3 α (membro 3 alfa da família de regeneração) de 3 até 24 meses após o TCTH (Figura 46B). Já o ST2 (fator de supressão da tumorigenicidade ou receptor da IL-33) teve sua concentração reduzida após o transplante (6, 12 e 36 meses) (Figura 46C), assim como o HGF (fator de crescimento de hepatócitos), cujo os níveis foram reduzidos 1 e 2 anos após o TCTH. A concentração de HGF foi maior nos pacientes pré-transplante que em indivíduos sadios (Figura 46D). A IL-33 também foi dosada em nosso trabalho, porém devido à grande variação dos valores de cada amostra, não possível analisar essa citocina pelo modelo estatístico proposto. Dados referentes à IL-33 estão no Apêndice Q.

Além do HGF, os níveis de April (ligante indutor de proliferação) foi maior nos pacientes pré-transplante comparado aos indivíduos sadios e diminuíram após o transplante (3, 12, 24 e 60 meses) (Figura 47A). A concentração plasmática de BAFF (fator ativador de células B) aumentou até 1 ano após o transplante (Figura 47B).

Figura 46 - Níveis plasmáticos de biomarcadores da DECH em pacientes com DF tratados com TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL da **(A)** subunidade alfa do receptor da IL-2 (ou CD25), **(B)** membro 3 alfa da família de regeneração **(C)** fator de supressão da tumorigenicidade e **(D)** fator de crescimento de hepatócitos. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P<0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 47 - Níveis plasmáticos de APRIL e BAFF em pacientes com DF tratados com TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL do (A) APRIL, ligante indutor de proliferação e (B) BAFF, fator ativador de células B. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Quanto aos níveis plasmáticos das citocinas IL-15, IL-21 e IL-22, poucas alterações foram observadas. A concentração de IL-15 foi maior no pré-transplante que em indivíduos saudáveis (Figura 48A), a concentração de IL-21 reduziu 24 meses após o transplante comparado ao pré-transplante (Figura 48B) e não foram observadas alteração nos níveis de IL-22 (Figura 48C).

Figura 48 - Níveis plasmáticos das citocinas IL-15, IL-21 e IL-22 em pacientes com DF tratados com TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL de (A) IL-15, (B) IL-21 e (C) IL-22. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre indivíduos saudáveis e o pré-transplante por ** ($P < 0,05$). A média está representada por +. HD: indivíduos saudáveis; Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

5.5.1 Comparação entre a reconstituição imunológica de pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o transplante

Após a avaliação geral da reconstituição imunológica de todos os pacientes com DF tratados, analisamos separadamente a reconstituição dos pacientes que perderam e não perderam o enxerto, com objetivo de detectar diferentes perfis de reconstituição ou resposta imunológica. O número de leucócitos diminuiu até 12 meses nos pacientes que não perderam o enxerto e no primeiro mês nos que perderam (Figura 49A). O número de neutrófilos reduziu 1 mês após o transplante comparado ao pré-transplante em ambos os grupos (Figura 49B) e o de linfócitos até 6 meses no grupo de pacientes que não perderam o enxerto e no primeiro mês no grupo que perdeu o enxerto (Figura 49C).

Figura 49 - Números absolutos de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) leucócitos totais, (B) neutrófilos e (C) linfócitos. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Houve redução do número de linfócitos T até 3 meses após o transplante nos pacientes que não perderam o enxerto e apenas no primeiro mês nos pacientes que perderam. Interessantemente, 24 meses após o TCTH, houve aumento do número de células T nos pacientes que não perderam o enxerto comparado aos que perderam (Figura 50A). Os números de linfócitos B diminuíram até 3 meses em ambos os grupos, sobretudo nos pacientes que perderam o enxerto (Figura 50B).

Figura 50 - Números absolutos de linfócitos T e B em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T e (B) linfócitos B. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Especificamente, o número de linfócitos T CD4+ foi reduzido até 3 meses e 6 meses nos pacientes que perderam e nos que não perderam o enxerto, respectivamente, sendo maior em 24 meses após o TCTH nos pacientes que não perderam o enxerto comparado aos que perderam (Figura 51A). O número de linfócitos T CD8+ aumentou 24 meses pós-TCTH somente nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 51B). Ambos os grupos tiveram inversão da razão CD4/CD8 após o transplante, porém essa inversão foi mais acentuada nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 51C).

Figura 51 - Números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos TCD4+, (B) linfócitos TCD8+ e (C) razão CD4/CD8. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Em comparação ao período pré-TCTH, o número de células T recém-emigrantes do timo diminuiu até 6 meses após o transplante somente no grupo de pacientes que não perdeu o enxerto e aumentou posteriormente aos 60 meses pós-TCTH (Figura 52).

Figura 52 - Números absolutos de linfócitos T recém emigrantes do timo em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de células CD3+CD4+CD45RA+CD31+ (RTE). O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

As células T CD4+ *naïve* diminuíram até 6 meses após o transplante comparado ao pré-TCTH nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 53A), enquanto as células T CD4+ efetoras aumentaram 6 e 24 meses após o transplante nesse mesmo grupo (Figura 53B). As células T CD4+ de memória efetora aumentaram 24 e 60 meses nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 53C) e as células T CD4+ de memória central reduziram até 3 meses em ambos os grupos de pacientes (Figura 53D). Comparando os dois grupos entre si, houve redução do número de células T CD4+ de memória efetora 12 meses pós-transplante nos pacientes que perderam o enxerto (Figura 53C).

Figura 53 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD4+ em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+ *naive*, (B) linfócitos T CD4+ efetoras, (C) linfócitos T CD4+ de memória efetora e (D) linfócitos T CD4+ de memória central. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Em relação a células T CD8+, foi observada redução do número de células T CD8+ *naive* em 1 e 3 meses após o transplante no grupo que perdeu o enxerto e no que não perdeu o enxerto, respectivamente (Figura 54A). O número de células T CD8+ efetoras aumentou após o TCTH somente nos pacientes que não perderam o enxerto, sendo observado aumento significativo no número dessas células em 1-2 anos pós-transplante no grupo de pacientes que não perdeu o enxerto comparado ao que perdeu (Figura 54B). As células T CD8+ de memória efetora diminuíram 1 mês após o TCTH nos pacientes que perderam o enxerto e aumentaram a partir de 24 meses nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 54C). Comparado ao pré-transplante, o número das células T CD8+ de memória central reduziu 1 mês pós-transplante nos pacientes que perderam o enxerto (Figura 54D). Além disso, o número dessas células foi menor nesse mesmo período nos pacientes que perderam o enxerto comparado aos que não perderam (Figura 54D).

Figura 54 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD8+ em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD8+ *naive*, (B) linfócitos T CD8+ efetoras, (C) linfócitos T CD8+ de memória efetora e (D) linfócitos T CD8+ de memória central. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

As células B *naive* diminuíram até 3 meses após o TCTH nos pacientes que não perderam o enxerto e aumentaram 2-3 anos comparado ao período pré-transplante (Figura 55A). Nos pacientes que perderam o enxerto, houve diminuição dessas células 1 mês após o transplante comparado ao pré-transplante. Além disso, pacientes que perderam o enxerto possuem menor número de células B *naive* 36 meses após o transplante comparado ao grupo que não perdeu o transplante (Figura 55A). Comparado ao período pré-transplante, a células B *naive* ativadas diminuíram 1 mês após o transplante em ambos os grupos e aumentaram 24, 36 e 60 meses pós-transplante nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 55B). As células B pré-centro germinativo também diminuíram 1 mês pós-transplante nos dois grupos e aumentaram 24 e 60 meses nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 55C). Houve redução do número de centroblastos/centrócitos 1, 6 e 12 meses após o transplante nos pacientes que perderam o enxerto e redução dessas células até 3 meses após o transplante seguido de aumento em 60 meses nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 55D).

O número de células B de memória recente diminuiu até 6 meses pós-transplante nos pacientes que não perderam o enxerto, ao passo que permaneceu reduzido até 36 meses nos pacientes que perderam enxertia (Figura 55E). Além disso, 24 meses após o transplante, foi observado menor número de células B de memória nos pacientes que perderam o enxerto comparado aos que não perderam (Figura 55E). As células B de memória tardia reduziram 1, 3 e 36 meses pós-transplante, comparado ao período pré-TCTH, nos pacientes que perderam o enxerto. Além disso, o número de células B de memória tardia diminuiu 1 e 3 meses pós-transplante no grupo de pacientes que não perdeu o enxerto (Figura 55F). Os pacientes que perderam o enxerto tiveram menor número de células B de memória tardia 36 meses pós-transplante que os pacientes que não perderam enxertia (Figura 55F).

Figura 55 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos B em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócito B naïve, (B) linfócito B naïve ativado, (C) linfócito B pré-centro germinativo, (D) centroblasto/centrócito, (E) linfócito B de memória recente e (F) linfócito B de memória tardia. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre os grupos por # ($P<0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Em relação expressão de PD-1 em células T e B, não foi observada alteração no número de células T e B PD-1+ após o transplante no grupo de pacientes que perderam o enxerto, comparado ao pré-TCTH (Figura 56). Nos pacientes que não perderam o enxerto, foi observado diminuição de células T CD4 PD1+ 1 mês pós-transplante seguido do aumento em 12 e 60 meses (Figura 56A), redução de células T CD8 PD1+ 1 mês após o transplante (Figura 56B) e aumento de células B PD1+ aos 12, 24, 48 e 60 meses pós-transplante (Figura 56C). Também foi observado menor número de células T CD8

PD1+ em 12 meses após o transplante nos pacientes que perderam o enxerto comparado aos que não perderam (Figura 56B).

Figura 56 - Números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B expressando PD-1 em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+PD-1+, (B) linfócitos T CD8+PD-1+ e (C) linfócitos B PD-1+. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Avaliamos também a reconstituição de várias subpopulações de células de perfil regulador. O aumento do número de células T CD4+CD25hiGITR+ após o transplante (12-36 meses) foi observado somente nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 57A). Comparado ao pré-transplante, as células T reguladoras clássicas (CD4+CD25hiFoxp3+) foram reduzidas até 6 meses nos pacientes que não perderam o enxerto e somente aos 3 meses pós-TCTH nos pacientes que perderam a enxertia (Figura 57B). A concentração sérica de TGF- β também foi reduzida até 6 meses após o transplante somente nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 58).

Figura 57- Números absolutos de subpopulações de células T CD4+ reguladoras em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+CD25hiGITR+ e (B) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 58 - Níveis séricos de TGF- β em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Concentração em pg/mL de TGF- β . O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Não foram observadas diferenças no número das células T reguladoras ativadas (Figura 59) e nem de células T reguladoras expressando o CD73 (Figura 60B) antes e após o transplante e nem quando comparado os grupos entre si. Porém, houve maior número de células T reguladoras

expressando CD39 aos 24 meses pós-transplante nos pacientes com AF que não perderam o enxerto comparado aos que perderam (Figura 60A).

Figura 59 - Números absolutos de subpopulações de células TCD4+ reguladoras ativadas em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de T CD4+CD25hiFoxp3+CD69+. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 60 - Números absolutos de subpopulações de células TCD4+ reguladoras expressando ectonucleotidases em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+CD39+ e (B) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+CD73+. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

O número de células T CD8+CD28-CD57+ aumentou a partir de 6 meses comparado ao pré-transplante nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 61A). Além disso, quando comparado os grupos entre si, foi demonstrado maior número dessas células 24 meses pós-transplante nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 61A). O número de células T CD8+CD28-Foxp3+ também aumentou 24 meses pós-TCTH, comparado ao período pré-transplante, nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 61B).

Figura 61 - Números absolutos de subpopulações de células T CD8+ reguladoras em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD8+CD28-CD57+ e (B) linfócitos T CD8+CD28-Foxp3+. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Comparado ao pré-transplante, houve um aumento da frequência das MDSC monocíticas 1 mês após o transplante nos pacientes que não perderam o enxerto (Figura 62A). Interessantemente, também nesse período, o grupo que não perdeu enxertia apresentou maior frequência das MDSC monocíticas comparado ao grupo que perdeu o enxerto (Figura 62A)

Figura 62 – Frequência de células supressoras derivadas da linhagem mieloide em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Frequência de células supressoras derivadas da linhagem mieloide (A) monocíticas e (B) granulocíticas. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

O número de células NK reduziu 1 mês após o transplante nos pacientes que perderam o enxerto e aumentou a partir de 24 meses nos pacientes que não perderam (Figura 63A). Já o número de células iNKT aumentou aos 3 e 36 meses pós-transplante nos pacientes que perderam o enxerto (Figura 63B). Além disso, 3 meses pós-TCTH, os pacientes que perderam o enxerto apresentaram maior número de células iNKT que os pacientes que não perderam o enxerto (Figura 63B).

Figura 63 - Células NK e iNKT em pacientes com DF que perderam e não perderam o enxerto após o TCTH.

Número absoluto de (A) células NK e (B) células iNKT. O grupo que não perdeu o enxerto está representado em preto e o grupo que perdeu o enxerto está representado em verde. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

5.5.2 Comparação entre a reconstituição imunológica de pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH após o transplante

Avaliamos também os perfis de reconstituição imunológica dividindo os pacientes com DF em pacientes que não desenvolveram DECH, pacientes que desenvolveram DECH aguda e pacientes que desenvolveram DECH crônica. Inicialmente, comparamos os pacientes que não desenvolveram DECH com os que desenvolveram DECH aguda e, em seguida, comparamos os pacientes que não desenvolveram DECH com os que desenvolveram DECH crônica.

5.5.2.1 Pacientes que desenvolveram DECH aguda após TCTH

Comparado ao período antes do transplante, foi observado redução dos leucócitos 1 mês e até 3 meses nos pacientes que não tiveram DECH e nos pacientes que tiveram DECHa, respectivamente (Figura 64A). O número de neutrófilos foi reduzido 1 mês após o transplante nos dois grupos (Figura 64B). O número de linfócitos totais diminuiu até 3 meses nos pacientes com DECHa e até 6 meses nos que não tiveram DECH (Figura 64C). Comparado ao período pré-transplante, o número de linfócitos aumentou 24 meses após o transplante nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 64C).

Figura 64 - Números absolutos de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) leucócitos totais, (B) neutrófilos e (C) linfócitos. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

O número de linfócitos T reduziu até 3 meses comparado ao pré-TCTH nos pacientes que tiveram DECHa e somente em 3 meses no grupo que não teve DECH (Figura 65A). Além disso, 1 mês após o transplante, o grupo de pacientes com DECHa apresentou menor número de linfócitos T que o grupo sem DECH (Figura 65A). Além disso, houve redução de linfócitos B até 3 meses pós-transplante nos dois grupos (Figura 65B).

Figura 65 - Números absolutos de linfócitos T e B em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T e (B) linfócitos B. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Especificamente, o número de linfócitos T CD4+ diminuiu até 3 e 6 meses nos pacientes com DECHa e nos que não tiveram DECH, respectivamente (Figura 66A). Os linfócitos T CD8+ diminuíram 1 mês após o transplante nos pacientes com DECHa e aumentaram aos 24 meses pós-transplante nos pacientes que não tiveram DECH. Ademais, 1 mês após o transplante, o grupo com DECHa apresentou menores números de linfócitos T CD4+ e T CD8+ que o grupo de pacientes sem DECH (Figura 66A e Figura 66B). Foi observada a inversão da razão CD4/CD8 após o TCTH nos dois grupos (Figura 66C).

Figura 66 - Números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH

Número absoluto de (A) linfócitos TCD4+, (B) linfócitos TCD8+ e (C) razão CD4/CD8. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Os linfócitos T recém-emigrantes do timo diminuíram 1 mês pós-TCTH nos pacientes com DECHa e entre 3-6 meses nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 67). Foi observado aumento do número dessas células 24 meses após o transplante nos pacientes que não tiveram DECH e 60 meses nos que tiveram DECHa (Figura 67).

Figura 67 - Números absolutos de linfócitos T recém emigrantes do timo (RTE) em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de células CD3+CD4+CD45RA+CD31+ (RTE). O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre os grupos por # ($P<0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

O número de linfócitos T CD4+ *naive* reduziu 1 mês após o TCTH nos pacientes com DECHa e 3-6 meses nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 68A). Comparando os dois grupos, foi demonstrado menor número de linfócitos T CD4+ *naive* nos pacientes com DECHa 24 meses após o transplante (Figura 68A). As células T CD4+ efetoras aumentaram 6 meses após o transplante nos dois grupos e 24 meses pós-TCTH no grupo de pacientes sem DECH (Figura 68B). As células T CD4+ de memória efetora aumentaram 3 e 24 meses após o transplante no grupo de pacientes sem DECH e aos 6 e 60 meses no grupo que teve DECHa (Figura 68C). Houve redução das células T CD4+ de memória central até 3 meses nos pacientes que tiveram DECHa e em 3 meses nos pacientes sem DECH (Figura 68D). Quando comparado os dois grupos, menor número de células T CD4+ de memória central foi observado no grupo de pacientes com DECHa 1 mês pós-transplante (Figura 68D).

Figura 68 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD4+ em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+ *naive*, (B) linfócitos T CD4+ efetoras, (C) linfócitos T CD4+ de memória efetora e (D) linfócitos T CD4+ de memória central. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Houve também uma redução do número de linfócitos T CD8+ *naive* 1 mês e 3 meses após o transplante nos pacientes com DECHa e sem DECH, respectivamente (Figura 69A). Ademais, comparando os dois grupos, foi observado menor número de linfócitos T CD8+ *naive* nos pacientes com DECHa 1 mês pós-transplante (A). As células T CD8+ efetoras diminuíram 1 mês após o transplante e aumentaram aos 12 meses no grupo de pacientes com DECHa, enquanto aumentaram entre 12-24 meses pós-transplante no grupo de pacientes que não teve DECH (Figura 69B). O número de células T CD8+ de memória efetora diminuiu 1 mês após o transplante e aumentou aos 24 meses nos pacientes com DECHa e entre 12-24 meses pós-transplante no grupo de paciente sem DECH (Figura 69C). As células T CD8+ de memória central aumentaram 1 mês pós-TCTH nos pacientes com DECHa e 24 meses nos pacientes que não desenvolveram DECH (Figura 69D). Comparando os grupos, as células T CD8+ de memória efetora diminuíram nos pacientes com DECHa 1 mês após o transplante. Por outro lado, as células T CD8+ de memória central aumentaram nos pacientes com DECHa, comparado aos pacientes sem DECH, nesse mesmo período (Figura 69C e Figura 69D).

Figura 69 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD8+ em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD8+ *naive*, (B) linfócitos T CD8+ efetoras, (C) linfócitos T CD8+ de memória efetora e (D) linfócitos T CD8+ de memória central. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

As células B *naive* diminuíram 1 mês após o transplante nos pacientes com DECHa e até 3 meses nos pacientes que não desenvolveram DECH (Figura 70A). Já o número das células B *naive* ativadas diminuiu 1 mês após o transplante nos dois grupos e aumentou 24 meses pós-transplante no grupo de pacientes sem DECH (Figura 70B). As células B pré-centro germinativo e os centroblastos/centrócitos reduziram até 3 meses nos pacientes com DECHa e no primeiro mês nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 70C e Figura 70D). O número de centroblastos/centrócitos aumentou 60 meses pós-transplante nos pacientes que desenvolveram DECH (Figura 70D). Houve redução do número de células B de memória recente até 3 meses pós-transplante nos pacientes com DECHa e até 12 meses nos pacientes que não desenvolveram DECH (Figura 70E). Além disso, o número de células B de memória tardia diminuiu nos 3 primeiros meses nos dois grupos de pacientes (Figura 70F).

Comparando os dois grupos, foi observado maior número de células B *naïve* e menor número de células B pré-centro germinativo nos pacientes com DECHa aos 3 meses pós-transplante (Figura 70A e Figura 70C).

Figura 70 – Números absolutos de subpopulações de linfócitos B em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócito B *naïve*, (B) linfócito B *naïve* ativado, (C) linfócito B pré-centro germinativo, (D) centroblasto/centrócito, (E) linfócito B de memória recente e (F) linfócito B de memória tardia. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Interessantemente, os pacientes que desenvolveram DECHa tiveram menor número de células T CD4+PD1+ e de células T CD8+PD1+ que os pacientes que não desenvolveram DECH 1 mês após o transplante (Figura 71A e Figura 71B). Além disso, comparado com o período pré-transplante, houve aumento das células B PD1+ entre 12-48 meses pós-transplante somente nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 71C).

Figura 71 - Números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B expressando PD-1 em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+PD-1+, (B) linfócitos T CD8+PD-1+ e (C) linfócitos B PD-1+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Houve um aumento de células T CD4+CD25hiGITR+ de 6 até 48 meses após o transplante nos pacientes que não desenvolveram DECH, ao passo que nos pacientes com DECHa esse aumento foi visto somente aos 24 meses pós-transplante (Figura 72A). Além disso, quando comparado os dois grupos, os pacientes com DECHa apresentaram menor número de células T CD4+CD25hiGITR+ 48 meses após o transplante (Figura 72A). O número de células T reguladoras convencionais (CD4+CD25hiFoxp3+) reduziu no primeiro mês pós-TCTH nos pacientes com DECHa e até 6 meses

nos pacientes que não desenvolveram DECHa (Figura 72B). Além disso, os níveis séricos de TGF- β foram reduzidos até 6 meses, aumentando 24 e 36 meses após o TCTH nos pacientes que não desenvolveram DECH (Figura 73). Os pacientes que não desenvolveram DECH apresentaram maior concentração de TGF- β que os pacientes com DECHa no período de 36 meses após o TCTH (Figura 73).

Figura 72 - Números absolutos de supopulações de células T CD4+ reguladoras em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+CD25hiGITR+ e (B) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre os grupos por # (P<0,05). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 73 - Níveis séricos de TGF- β em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Concentração em pg/mL de TGF- β . O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Não foram observadas alterações pós-transplante no número de células T reguladoras ativadas e de células T reguladoras expressando CD39 (Figura 74e Figura 75A). Também não houve diferença no número dessas células entre os grupos pacientes que desenvolveram ou não DECHa (Figura 74e Figura 75A). Contudo, o número de células T reguladoras expressando CD73 aumentou nos pacientes que desenvolveram DECH aguda 12 meses após o transplante comparado ao pré-transplante, assim como o número dessas células foi maior no grupo de pacientes com DECHa comparado ao grupo sem DECH nesse período (Figura 75B).

Figura 74 - Números absolutos de supopulações de células TCD4+ reguladoras ativadas em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de T CD4+CD25hiFoxp3+CD69+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre os grupos por # (P<0,05). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 75 - Números absolutos de subpopulações de células TCD4+ reguladoras expressando ectonucleotidases em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+CD39+ e (B) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+CD73+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * (P<0,05) e entre os grupos por # (P<0,05). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Comparado ao período pré-transplante, o número de células T reguladoras CD8+CD28-CD57+ aumentou a partir de 6 meses pós-TCTH nos dois grupos de pacientes, sendo esse aumento observado até 48 meses nos pacientes que não desenvolveram DECH e até 60 meses nos que desenvolveram DECHa (Figura 76A). Já as células T reguladoras CD8+CD28-Foxp3+ diminuíram no primeiro mês após o transplante nos pacientes com DECHa e aumentaram entre 12-24 meses pós-transplante nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 76B).

Figura 76 - Números absolutos de subpopulações de células T CD8+ reguladoras em pacientes com que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD8+CD28-CD57+ e (B) linfócitos T CD8+CD28-Foxp3+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Quanto à reconstituição de MDSC, foi observado aumento da frequência de MDSC monocíticas e de MDSC granulocíticas 1 mês pós-transplante, comparado ao período pré-transplante, somente nos pacientes que desenvolveram DECHa (Figura 77).

Figura 77 – Frequência de células supressoras derivadas da linhagem mieloide em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Frequência de células supressoras derivadas da linhagem mieloide (A) monocíticas e (B) granulocíticas. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

As células NK diminuíram até 3 meses pós-transplante nos pacientes com DECHa e aumentaram entre 2 e 4 anos pós-TCTH nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 78A). Já as células iNKT aumentaram nos pacientes com DECHa 3 meses após o transplante (comparado ao pré-TCTH), enquanto o número dessas células diminuiu nos pacientes que não desenvolveram DECH no mesmo período (Figura 78B). O número de células iNKT também aumentou 36 meses pós-transplante nos pacientes com DECHa (Figura 78B). Além disso, quando comparado os dois grupos, o número de células iNKT foi maior nos pacientes que desenvolveram DECHa aos 3 e 36 meses após o transplante (Figura 78B).

Figura 78 - Células NK e iNKT em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Número absoluto de (A) células NK e (B) células iNKT. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Como esperado, houve aumento da concentração de CD25 nos pacientes com DECHa em relação aos pacientes que não desenvolveram DECH aos 6 meses pós-transplante (Figura 79A). Além disso, comparado ao período pré-transplante, enquanto houve aumento dos níveis de CD25 até 6 meses pós-TCTH no grupo sem DECH, no grupo de pacientes que desenvolveu DECHa esse aumento durou até 2 anos após o transplante (Figura 79A). A concentração de Reg3 α também aumentou a partir de 3 meses pós-transplante nos dois grupos de pacientes. Porém, esse aumento foi observado até 12 meses nos pacientes com DECHa e até 6 meses nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 79B). Os níveis de ST2 diminuíram 1, 6, 12, 24 e 36 meses após o transplante nos pacientes que não desenvolveram DECH e aumentaram 3 meses após o transplante nos que tiveram DECHa (Figura 79C). A concentração de HGF aumentou 1 mês após o transplante somente nos pacientes com DECHa (Figura 79D).

Figura 79 - Níveis plasmáticos de biomarcadores da DECH em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL de (A) subunidade alfa do receptor da IL-2 (ou CD25), (B) membro 3 alfa da família de regeneração (C) fator de supressão da tumorigenicidade e (D) fator de crescimento de hepatócitos. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Os níveis plasmáticos de April diminuíram até 3 anos após o TCTH nos pacientes que não tiveram DECH e aumentaram 1 mês pós-transplante nos pacientes com DECHa (Figura 80A). Comparando os dois grupos, a concentração de April foi maior nos pacientes com DECHa que nos pacientes sem DECH no período 1 mês após o transplante (Figura 80A). A concentração de BAFF aumentou até 6 meses pós-transplante nos pacientes que tiveram DECHa e até 12 meses nos que não desenvolveram DECH (Figura 80B).

Figura 80 - Níveis plasmáticos de April e BAFF em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL de (A) ligante indutor de proliferação e (B) fator ativador de células B. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Embora os níveis de IL-15 tenham sido menores no período pré-transplante nos pacientes que desenvolveram DECHa do que nos pacientes que não desenvolveram, no primeiro mês pós-transplante a concentração dessa citocina foi maior no grupo de pacientes com DECHa do que no grupo sem DECH (Figura 81A). Além disso, a concentração de IL-15 aumentou até 24 meses pós-TCTH nos pacientes com DECHa e diminuiu 24 e 36 meses pós-transplante nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 81A), comparado ao pré-transplante. A concentração de IL-21 diminuiu 24 meses após o transplante, comparado ao pré-TCTH, nos pacientes que não tiveram DECH (Figura 81B). Os níveis de IL-22 aumentaram 24 meses após o transplante nos pacientes que tiveram DECHa (Figura 81C). Além disso, quando comparado ao grupo de pacientes que não desenvolveu DECHa, a concentração de IL-22 foi maior no grupo com DECHa aos 24 meses pós-transplante (Figura 81C).

Figura 81 - Níveis plasmáticos das citocinas IL-15, IL-21 e IL-22 em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH aguda após o TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL de **(A)** IL-15, **(B)** IL-21 e **(C)** IL-22. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH aguda está representado em vermelho. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

5.5.2.2 Pacientes que desenvolveram DECH crônica após o TCTH

Além da avaliação da reconstituição imunológica dos pacientes que desenvolveram DECHa e dos pacientes que não desenvolveram DECH, nós também avaliamos a reconstituição imunológica dos pacientes que desenvolveram DECH crônica após o TCTH. Embora os dados dos pacientes que não desenvolveram DECH estejam representados nos gráficos seguintes, enfatizaremos a reconstituição pós-transplante dos pacientes que desenvolveram DECH crônica, uma vez que os pacientes que não desenvolveram DECH já tiveram seus resultados descritos na seção anterior juntamente com os pacientes que desenvolveram DECHa. Da mesma forma que comparamos os perfis de reconstituição imune dos pacientes que desenvolveram DECHa com aqueles que não desenvolveram DECH, nessa seção, o grupo “ausência DECH” foi utilizado para a comparação com pacientes que desenvolveram DECHc.

No que se refere aos leucócitos e neutrófilos, observamos redução dessas células 1 mês após o transplante nos pacientes que desenvolveram DECHc (Figura 82A e Figura 82B). O número de linfócitos foi reduzido 1 e 6 meses após o transplante nos pacientes com DECHc (Figura 82C).

Figura 82 - Números absolutos de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) leucócitos totais, (B) neutrófilos e (C) linfócitos. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Não foi observado alteração no número de linfócitos T totais após o TCTH em pacientes com DECHc (Figura 83A), porém houve redução do número de células B até 3 meses pós-transplante (Figura 83B). Além disso, o número de células B foi menor nos pacientes com DECHc comparado aos pacientes que não tiveram DECH 3 meses após o transplante (Figura 83B). Também não houve mudança no número de células T CD4+ e T CD8+ após o transplante (Figura 84A e B) embora tenha havido a redução da razão CD4/CD8 entre 3-12 meses após o transplante nos pacientes com DECHc (Figura 84C). Ademais, não houve alteração no número de células T recém-emigrantes do timo nos pacientes com DECHc após o TCTH (Figura 85).

Figura 83 - Números absolutos de linfócitos T e B em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T e (B) linfócitos B. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 84 - Números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos TCD4+, (B) linfócitos TCD8+ e (C) razão CD4/CD8. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 85 – Números absolutos de linfócitos T recém emigrantes do timo em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de células CD3+CD4+CD45RA+CD31+ (RET). O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Em relação as subpopulações de linfócitos T CD4+, houve redução apenas do número de células T CD4+ *naive* 1 mês após o transplante nos pacientes com DECHc, comparado ao período pré-TCTH (Figura 86). Comparado ao grupo ausência DECH, houve uma redução das células T CD4+ efectoras 24 meses após o transplante no grupo de pacientes com DECHc (Figura 86B). Em relação as subpopulações de linfócitos T CD8+, não houve alterações após o transplante, comparado ao período pré-transplante (Figura 87). Porém, houve aumento do número de células T CD8+ de memória central nos pacientes com DECHc no período 3 meses pós-TCTH, comparado aos pacientes que não desenvolveram DECH (Figura 87D).

Figura 86 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD4+ em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+ *naive*, (B) linfócitos T CD4+ efetoras, (C) linfócitos T CD4+ de memória efetora e (D) linfócitos T CD4+ de memória central. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P<0,05$) e entre os grupos por # ($P<0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 87 - Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD8+ em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD8+ *naive*, (B) linfócitos T CD8+ efetoras, (C) linfócitos T CD8+ de memória efetora e (D) linfócitos T CD8+ de memória central. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Nos pacientes com DF que desenvolveram DECHc, houve diminuição dos números de células B *naive*, de memória recente e de memória tardia 1 mês pós-transplante, comparado ao período pré-transplante (Figura 88). Comparado ao grupo de pacientes que não desenvolveu DECH, o número de células B *naive* foi maior aos 3 meses pós-transplante nos pacientes com DECHc (Figura 88A).

Figura 88 – Números absolutos de subpopulações de linfócitos B em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócito B naïve, (B) linfócito B naïve ativado, (C) linfócito B pré-centro germinativo, (D) centroblasto/centrócito, (E) linfócito B de memória recente e (F) linfócito B de memória tardia. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 89 - Números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B expressando PD-1 em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+PD-1+, (B) linfócitos T CD8+PD-1+ e (C) linfócitos B PD-1+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Não houve alterações após o TCTH nos números de linfócitos T e B expressando PD1 nos pacientes que desenvolveram DECHc (Figura 89).

Também não houve alteração no número de células T CD4+ reguladoras após o transplante nos pacientes com DECHc (Figura 90). No entanto, observamos redução dos níveis séricos de TGF- β 3 e 12 meses pós-transplante nesses pacientes, comparado ao período pré-transplante (Figura 91).

Figura 90 – Números absolutos de subpopulações de células T CD4+ reguladoras em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+CD25hiGITR+ e (B) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 91 - Níveis séricos de TGF- β em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Concentração em pg/mL de TGF- β . O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Os números de células T reguladoras ativadas e expressando CD39 ou CD73 não alteraram após o transplante no pacientes com DECHc, comparado ao pré-TCTH (Figura 92 e Figura 93).

Figura 92 - Números absolutos de subpopulações de células TCD4+ reguladoras ativadas em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de T CD4+CD25hiFoxp3+CD69+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 93 - Números absolutos de subpopulações de células TCD4+ reguladoras expressando ectonucleotidases em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+CD39+ e (B) linfócitos T CD4+CD25hiFoxp3+CD73+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 94 - Números absolutos de subpopulações de células T CD8+ reguladoras em pacientes com que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) linfócitos T CD8+CD28-CD57+ e (B) linfócitos T CD8+CD28-Foxp3+. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 95 – Frequência de células supressoras derivadas da linhagem mieloide em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Frequência de células supressoras derivadas da linhagem mieloide (A) monocíticas e (B) granulocíticas. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Após o transplante, os números de células T CD8⁺ reguladoras, de células NK e células iNKT e a frequência de MDSC, não foram alterados nos pacientes com DECHc (Figura 94, Figura 95 e Figura 96).

Figura 96 - Células NK e iNKT em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Número absoluto de (A) células NK e (B) células iNKT. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Em relação aos biomarcadores de DECH, houve um aumento da concentração plasmática de CD25 (Figura 97A), de Reg3 α (Figura 97B) e de BAFF (Figura 98B) 3 meses após o transplante nos pacientes com DECHc, comparado ao período pré-transplante. O nível de IL-15 também aumentou 3 e 12 meses após o transplante nos pacientes que desenvolveram DECHc (Figura 99).

Figura 97 - Níveis plasmáticos de biomarcadores da DECH em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL de (A) subunidade alfa do receptor da IL-2 (ou CD25), (B) membro 3 alfa da família de regeneração (C) fator de supressão da tumorigenicidade e (D) fator de crescimento de hepatócitos. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 98 - Níveis plasmáticos de April e BAFF em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL de (A) ligante indutor de proliferação e (B) fator ativador de células B. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Figura 99 - Níveis plasmáticos das citocinas IL-15, IL-21 e IL-22 em pacientes com DF que desenvolveram e não desenvolveram DECH crônica após o TCTH.

Concentração plasmática em pg/mL de (A) IL-15, (B) IL-21 e (C) IL-22. O grupo que não desenvolveu DECH está representado em preto e o grupo que desenvolveu DECH crônica está representado em azul. Diferenças estatísticas entre cada período pós-transplante e o pré-transplante estão representadas por * ($P < 0,05$) e entre os grupos por # ($P < 0,05$). Pre: período pré-transplante.

Fonte: próprio autor

Discussão

6 Discussão

Parte I - Resposta clínica de pacientes com DF tratados com o TCTH

O primeiro TCTH realizado com sucesso em um paciente com DF foi descrito em 1984. Embora o transplante tenha sido indicado para o tratamento da leucemia mieloide aguda, foi observado que os sintomas clínicos da DF (que o paciente também possuía) melhoraram após o TCTH (Johnson *et al.*, 1984). Desde então, aproximadamente 1200 pacientes com DF foram tratados em diversos centros no mundo inteiro, nos quais diferentes regimes de condicionamentos, diferentes fontes das células-tronco hematopoéticas e níveis de compatibilidade entre doadores e pacientes foram usados (revisado em Bhatia e Sheth, 2015). Ainda que os dados sejam variáveis, devido à especificidade do tratamento de cada centro, os resultados obtidos nesses trabalhos (e em nosso estudo) indicam que TCTH é uma forma segura de tratamento e a única capaz de curar pacientes com DF atualmente (Walters *et al.*, 1996; Vermynen *et al.*, 1998; Panepinto *et al.*, 2007; Majumdar *et al.*, 2010; Lucarelli *et al.*, 2012; Locatelli *et al.*, 2013).

Em pacientes com DF que tiveram a reconstituição da medula do doador, foi observada a estabilização dos danos em diversos órgãos e, em alguns casos, foi possível observar um aumento do tamanho do baço, bem como a reativação da sua função (Vermynen *et al.*, 1998; Dallas *et al.*, 2013). Também foi descrito a normalização da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral após o transplante, assim como a redução de infartos silenciosos (Walters *et al.*, 1996; Bernaudin *et al.*, 2007). Além disso, um dado interessante foi que alguns pacientes que perderam a medula (reconstituição autóloga) tiveram melhora dos sintomas clínicos, pois foi observado aumento da HbF após o transplante (Vermynen *et al.*, 1998). Outro estudo mostrou que 3 pacientes (2 com beta-talassemia e 1 com AF) que perderam a medula após o transplante também apresentaram produção estável de HbF e, conseqüentemente, melhora do quadro clínico (Paciaroni e Lucarelli, 2012).

A introdução do ATG ao regime de condicionamento foi de grande importância para o sucesso dessa terapia, uma vez que o tratamento com ATG reduziu a incidência cumulativa de rejeição de 22,6% para 2,9%, resultando no aumento da reconstituição de células do doador e, conseqüentemente, em maior porcentagem de quimerismo misto (Bernaudin *et al.*, 2007). Recentemente, um estudo demonstrou que a administração de ATG em baixas doses [10mg/kg *versus* 20 mg/kg em Bernaudin e colaboradores (2007)] resultou na mesma incidência cumulativa de rejeição que o estudo anterior, sugerindo que a dose reduzida de ATG seria suficiente para a pega da medula ao mesmo tempo que diminuiria os riscos de reconstituição imunológica tardia e reativação viral após o transplante associados ao uso do ATG (Soni *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho, embora nossos pacientes tenham sido tratados com ATG durante o regime de condicionamento, 8 dos 40 pacientes tratados perderam o enxerto. Porém, é importante ressaltar que somente 2 pacientes faleceram em decorrência de complicações do transplante e que os pacientes curados tiveram melhora na qualidade de vida, assim como diminuição das crises de dor e internações. Nos pacientes que tiveram enxertia duradoura das CTHs do doador, observamos o aumento do número de células vermelhas, do hematócrito e da hemoglobina total após o transplante, assim como redução da hemoglobina S e dos reticulócitos, o que pode ser associado a melhora dos sintomas clínicos.

Hsieh e colaboradores (2014), também demonstraram que pacientes com DF tratados com condicionamento não mieloablativo (NMA) e CTH alogênicas apresentam aumento dos níveis de hemoglobina e diminuição da porcentagem de HbS e reticulócitos (Hsieh *et al.*, 2014). Vários trabalhos têm associado o número elevado de reticulócitos à complicações da doença, entre elas estão: alteração do fluxo sanguíneo cerebral, maiores taxas de acidente vascular cerebral e maiores taxas de episódios de vaso-oclusão (revisado por Meier *et al.*, 2017). Belisário e colaboradores (2016) demonstraram que o número de reticulócitos foi o principal fator preditor de alteração do fluxo sanguíneo cerebral e isquemia aguda em crianças com AF (Belisario *et al.*, 2016). Portanto, a diminuição de reticulócitos foi um dos parâmetros laboratoriais encontrados em nosso trabalho como um marcador hematológico de resposta clínica ao TCTH alogênico.

Vermeylen e colaboradores (1988) observaram que a intervenção precoce, antes das complicações decorrentes da doença, resultou em resposta melhor ao transplante. Os autores dividiram os pacientes tratados com o TCTH em dois grupos: o grupo 1 foi constituído por pacientes que já apresentavam comorbidades da doença e o grupo 2 foi constituído com pacientes sem comorbidades. Enquanto a probabilidade de sobrevivência do grupo 2 foi de 100%, a probabilidade do grupo 1 foi de 88%; já probabilidade de sobrevivência sem eventos da doença foi de 93% no grupo 2 e de 76% no grupo 1. Matthes-Martin e colaboradores (2008), em um estudo de avaliação dos riscos do transplante em crianças com diferentes doenças, demonstram que a idade do paciente, o grau da doença e o grau de incompatibilidade entre doador e paciente correlacionam positivamente com a mortalidade relacionada ao transplante. Um estudo recente mostrou que pacientes com DF com menos que 16 anos tiveram probabilidade de sobrevida global de 95% e sobrevida livre de eventos de 93% após 5 anos do transplante, enquanto em pacientes com mais de 16 anos tiveram probabilidade de sobrevida global e sobrevida livre de eventos de 81% (para ambas) (Gluckman *et al.*, 2017).

Além disso, pacientes mais velhos e/ou com maiores comorbidades muitas vezes não são indicados para o transplante com regime de condicionamento mieloablativo devido à sua toxicidade (hepática e neurológica) (Matthes-Martin *et al.*, 2008; revisado em Hsieh *et al.*, 2011; revisado em Kassim e Sharma, 2017). Também foi demonstrado que a incidência de DECH aguda foi maior em

pacientes com DF mais velhos (Gluckman *et al.*, 2017). Nesse sentido, estudos recentes vêm avaliando o uso de regimes de condicionamento de intensidade reduzida (RIC) ou NMA para o tratamento de pacientes com DF mais velhos e com maior comprometimento dos órgãos, porém os resultados obtidos ainda são variáveis com alguns grupos não atingindo sucesso no tratamento da DF (revisado em Hsieh *et al.*, 2011). Um estudo recente, após uma média de 4 anos de seguimento após o TCTH, demonstrou que o RIC seguido do transplante foi eficiente no tratamento de pacientes com DF, sendo que todos os pacientes foram curados e não foi observado o desenvolvimento de DECH. Entretanto, é importante ressaltar que se trata de um grupo pequeno de pacientes (N=8) e que um estudo mais amplo avaliando a eficácia do RIC em um número maior de pacientes deve ser realizado (Matthes-Martin *et al.*, 2013). Bhatia e colaboradores (2014) também demonstraram que RIC seguido do transplante (doadores aparentados) foi capaz de curar todos pacientes (N=18), porém 17% deles desenvolveram DECH agudo (II-IV) e 11% DECH crônico. Outros resultados não foram tão promissores, como no trabalho de Horan e colaboradores (2005) em que o condicionamento não mieloablativo não foi suficiente para tratar pacientes com DF e talassemia, pois 3 dos 4 pacientes perderam o enxerto após o transplante. O uso do regime não mieloablativo constituído por irradiação corpórea total (uma dose), alemtuzumab e rapamicina tem se mostrado promissor no tratamento de pacientes com DF mais velhos e com comorbidades que possuem irmãos HLA compatíveis. Nesse estudo, o tempo médio de imunossupressão foi longo (2 anos), porém apenas 4 pacientes rejeitaram o enxerto (um faleceu após a falha da enxertia devido a um acidente vascular cerebral) e nenhum paciente desenvolveu DECH (agudo ou crônico), mesmo após a retirada da imunossupressão pós-transplante (Hsieh *et al.*, 2009; Hsieh *et al.*, 2014).

Contudo, nossos dados indicam que o condicionamento mieloablativo seguido do TCTH foi seguro mesmo em pacientes mais velhos. Exceto o paciente DF2, que foi tratado com regime de condicionamento não mieloablativo, todos os pacientes foram tratados com MAC. Desses pacientes, 6 tinham idade variando de 30-39 anos, 8 pacientes tinham a idade variando de 20-29 anos e outros 26 pacientes tinham idade menor que 20 anos.

Outro fator que afeta a indicação do TCTH para pacientes com DF é a disponibilidade de doador compatível (Matthes-Martin *et al.*, 2008). De modo geral, o transplante é indicado para pacientes que possuem irmãos HLA compatíveis (Kassim e Sharma, 2017). Contudo, estima-se que somente 14-20% dos pacientes com DF tenham irmãos compatíveis e não afetados pela doença. Além disso, a probabilidade de se encontrar um doador HLA compatível (8/8) não aparentado é mais baixa em pacientes com DF devido à maior prevalência da doença em indivíduos negros. A probabilidade de se encontrar um doador HLA compatível varia entre os diferentes grupos étnicos, sendo menor entre negros que entre caucasianos (revisado em Bhatia e Sheth, 2015). Assim, estratégias que permitam

um número maior de pacientes com DF tratados com o TCTH vêm sendo desenvolvidas. Dentre elas, o uso de células-tronco hematopoéticas derivadas do cordão umbilical (CU) de doadores aparentados ou não e de doadores haploidênticos vem sendo estudado.

Nesse trabalho, investigamos vários parâmetros hematológicos que poderiam estar associados à melhora clínica dos pacientes com DF após o TCTH alogênico. Além da diminuição número de reticulócitos, outro fator possivelmente associado a melhora clínica dos pacientes seria a redução da expressão da molécula de adesão CD47 nos reticulócitos e das moléculas de adesão CD36 e CD49d nas hemácias e reticulócitos dos pacientes com DF que tiveram enxertia. De fato, estudos têm demonstrado que os reticulócitos e hemácias maduras de pacientes com DF possuem elevada expressão de moléculas de adesão, como CD47, CD49d, CD36 e Lu-BCAM, tornando essas células mais aderentes ao endotélio, o que contribui para o processo de vaso-oclusão (Stuart e Nagel, 2004; Zago e Pinto, 2007; Rees e Gibson, 2012; Sakamoto *et al.*, 2013). Foi descrito que um dos benefícios do tratamento dos pacientes com AF com hidroxiureia foi a redução da expressão de CD36 e CD49d, sobretudo em reticulócitos (Styles *et al.*, 1997).

Interessantemente, porcentagem de células vermelhas CD47⁺ foi menor em pacientes com DF antes do transplante comparado ao grupo controle, assim como a porcentagem dessas células aumentou após o TCTH nos pacientes que tiveram enxertia (e diminuiu nos que perderam o enxerto). De fato, o CD47 é uma molécula envolvida com a adesão celular, porém isso acontece principalmente em pacientes com DF (Brittain *et al.*, 2001; Brittain *et al.*, 2004). Foi demonstrado que o CD47 expresso nos reticulócitos de pacientes com DF possui conformação diferente do CD47 expresso nos reticulócitos de indivíduos sadios e que somente o CD47 de pacientes com DF foi capaz de se ligar a trombospondina 1. Além disso, a ligação de CD47 à trombospondina resultou na ativação da integrina VLA-4 (formada pelo CD49d e CD29) nos reticulócitos, aumentando a adesão dessas células em pacientes com DF (Brittain *et al.*, 2004). Contudo, o CD47 também tem importante função na regulação da fagocitose de células vermelhas senescentes por macrófagos do sistema retículo endotelial, o que pode explicar a maior expressão dessa molécula nas células vermelhas maduras após o transplante (Oldenberg *et al.*, 2000; Oldenberg *et al.*, 2001). De maneira geral, o CD47 expresso na superfície dessas células se liga ao receptor inibitório (SIRPα) dos macrófagos e impede a fagocitose (Oldenberg *et al.*, 2000; Oldenberg *et al.*, 2001). Por fim, Odièvre e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com a hidroxiureia também não foi capaz de induzir a redução dessa molécula de adesão. Mais do que isso, os autores mostraram que após o tratamento, o CD47 teve sua expressão aumentada tanto em reticulócitos como em células vermelhas maduras (Odièvre *et al.*, 2008).

Além da expressão de moléculas de adesão nas células vermelhas, avaliamos a concentração plasmática das moléculas de adesão P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 que também estão aumentadas

em pacientes com DF e estão associadas a sintomas clínicos mais severos e ao dano tecidual (Matsui *et al.*, 2001; Conran *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2005; Dworkis *et al.*, 2011). Ao contrário dos dados da literatura, em nosso trabalho, a concentração de ICAM-1 foi menor nos pacientes pré-transplante e aumentou 1 e 6 meses após o transplante comparado ao pré-TCTH, sobretudo nos pacientes que não perderam o enxerto. Além disso, a concentração de P-selectina não foi maior nos pacientes pré-transplante comparado aos indivíduos saudáveis e houve diminuição da concentração de P-selectina somente 1 mês após o transplante. Contudo, a concentração de VCAM-1 foi muito maior nos pacientes com DF comparado aos indivíduos saudáveis, diminuindo significativamente após o transplante, o que pode ter contribuído para a melhora dos sintomas clínicos dos pacientes em nosso trabalho.

Ademais, considerando que a inflamação é um processo característico nos pacientes com DF, nós avaliamos se a melhora clínica observada após o transplante poderia ser relacionada com a diminuição da resposta inflamatória nos pacientes. Em nosso trabalho, a expressão de genes de quimiocinas envolvidas sobretudo com o recrutamento de eosinófilos, linfócitos, basófilos e monócitos (porém não neutrófilos), como a CCL11, CCL16, CCL21, CCL8 e do gene da IL-5 foi diminuída nesses pacientes no período basal (antes do transplante) quando comparado com os indivíduos saudáveis. Interessantemente, genes de várias quimiocinas envolvidas com o recrutamento de leucócitos, sobretudo neutrófilos e macrófagos, tiveram sua expressão aumentada nos pacientes com DF quando comparados aos indivíduos saudáveis. Os genes do receptor do receptor da IL-8 (CXCR1) e do receptor da IL-1 β , duas importantes citocinas pró-inflamatórias envolvidas com a fisiopatologia da DF (Keikhaei *et al.*, 2013), também foram *up* regulados em pacientes com DF antes do transplante, entretanto, os níveis plasmáticos da IL-1 β e IL-8 foram muito baixos em nossos pacientes antes e após o transplante. Trabalhos recentes demonstraram que polimorfismos na região promotora do gene da IL-1 β foram associados à maior incidência de necrose óssea e redução do número de reticulócitos em pacientes com AF (Vicari *et al.*, 2015) e que a expressão de genes de componentes da via do inflamassoma NLRP3, como do NLRP3 e da IL-1 β , foi aumentada nas PBMC de pacientes com DF (Pitanga *et al.*, 2016).

Além disso, a expressão do gene da NOS2, a qual é responsável pela produção de óxido nítrico (NO) a partir da arginina, foi diminuída nos pacientes com DF pré-transplante e aumentada 1 ano após o transplante, contudo não foi observada diferença na concentração dos metabólitos do NO entre pacientes e indivíduos saudáveis, assim como houve aumento desses metabólitos somente 3 meses após o transplante em nosso estudo. Visto que nos pacientes com AF têm níveis diminuídos de NO, o aumento pós-transplante da concentração sérica de NO possivelmente contribuiu para melhora clínica dos pacientes.

Já no primeiro mês após o transplante, observamos que a expressão dos genes das quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, CCL2 e CCL7 foi diminuída quando comparado ao pré-transplante. Esses genes estavam *up* regulados nos pacientes pré-transplante quando comparados aos indivíduos saudáveis. Outros genes que codificam proteínas pró-inflamatórias também foram *down* regulados nesse período, sugerindo um importante papel do TCTH alogênico na modulação da resposta inflamatória, diminuindo a expressão de genes envolvidos com a ativação da inflamação logo após o transplante. Dentre eles, alguns genes são: CCR4, um receptor para quimiocinas envolvidas com o recrutamento de leucócitos (como MIP-1, CCL5 e MCP-1); CXCL6 quimiocina particularmente envolvida com o recrutamento de neutrófilos; citocinas IL-1 e IL-6 que são pró-inflamatórias.

Após a análise da expressão gênica do último período estudado (1 ano pós-transplante), foi visto aumento da expressão de genes das quimiocinas CCL4, CCL5 e CCL16 e citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF e IFN- γ , porém a expressão dos genes das quimiocinas envolvidas com o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8) se manteve diminuída. Quando feita a dosagem dessas diferentes citocinas e quimiocinas no plasma dos pacientes com DF tratados com o transplante, observamos que os níveis de TNF estavam aumentados nos pacientes com DF pré-transplante, assim como a IL-18 e o MIP-1 α . Porém, somente essas últimas tiveram a concentração diminuída após o transplante, sobretudo nos pacientes com DF que não perderam o enxerto. De maneira geral, nossos dados sugerem a modulação da resposta inflamatória em pacientes com DF após o transplante, sobretudo com a redução da expressão de genes de quimiocinas pró-inflamatórias e da produção de IL-18, MIP-1 α e MIP-1 β .

No que se refere a reconstituição da medula do doador, assim como em outros trabalhos, nossos dados indicam que não foi necessária a reconstituição total da medula do doador (quimerismo total) para que o paciente fosse curado, sendo que a maioria dos pacientes com DF se tornaram quimeras mistas após o transplante em nosso trabalho. O quimerismo total é caracterizado quando a porcentagem de células do doador no paciente é $\geq 95\%$ e o quimerismo misto quando a porcentagem de células do doador no paciente é $\geq 5\%$ (Locatelli *et al.*, 2013). A porcentagem média de células do doador foi maior em 6 meses (81,92%) e menor em 2 anos (68,81%) após o transplante, período no qual a maioria dos pacientes do grupo falha da enxertia já havia perdido a medula. Porém, a porcentagem média de células do doador se manteve acima de 77% até 5 anos após o transplante. Dados da literatura demonstraram que a reconstituição de 10-20% células do doador foi suficiente para a melhora dos sintomas clínicos da DF (Walters *et al.*, 1996; Vermynen *et al.*, 1998; Bernaudin *et al.*, 2007; Lucarelli e Gaziev, 2008; Rees *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2011; Khoury e Abboud, 2011; Lucarelli *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que o transplante foi realizado com sucesso mesmo com o doador era traço falciforme, embora a porcentagem de HbS tenha sido maior nesses casos (Walters *et*

al., 1996; Bhatia *et al.*, 2014; Soni *et al.*, 2014). De fato, em nosso estudo, pelo menos 21 pacientes receberam a medula de doadores traço falciforme. Destes, 18 foram não perderam o enxerto e apresentam melhora clínica.

Entretanto, uma importante complicação após o transplante foi o desenvolvimento da DECH (Bernaudin *et al.*, 2007; Panepinto *et al.*, 2007). Nos primeiros trabalhos, nos quais o principal regime de condicionamento foi o mieloablativo, cerca de 15-20% dos pacientes desenvolveram DECH (revisado em Hsieh *et al.*, 2011; revisado em Bhatia e Sheth, 2015). Bernaudin e colaboradores (2007) demonstraram que DECHa foi a principal causa de morte entre os pacientes com DF tratados com o TCTH, sendo observado relação direta entre o aumento da idade e a ocorrência de DECH. Embora em nosso trabalho, 14 dos 40 pacientes tenha desenvolvido DECHa e 6 tenham desenvolvido DECHc, é importante ressaltar que todos esses pacientes apresentaram a forma mais branda da doença e foram facilmente tratados. Apenas 1 paciente teve DECHa grau III, enquanto todos os outros tiveram DECHa até grau II. Todos os pacientes que desenvolveram DECHc tiveram a forma limitada da doença.

O uso de CU de irmãos HLA compatíveis como fonte de células-tronco hematopoéticas tem sido associado a menores taxas de desenvolvimento da DECH (Locatelli *et al.*, 2013). Recentemente, Locatelli e colaboradores (2013) descreveram os resultados do transplante de medula óssea e de CU de doadores aparentados em pacientes com hemoglobinopatias (talassemia e DF). Os autores observaram menor incidência de DECH grau II-III nos pacientes tratados com CU e ausência de DECH grau IV nesse grupo (enquanto 2% dos pacientes tratados com medula óssea desenvolveram DECH grau IV) (Locatelli *et al.*, 2013). Nenhum paciente tratado com o transplante de CU desenvolveu DECH crônico extensivo (12 pacientes tratados com medula óssea desenvolveram DECH extensivo) e nenhum paciente morreu de DECH (metade das mortes no grupo de pacientes tratados com medula óssea foi devido à DECH), porém a falha da enxertia também foi mais frequente nesse grupo de pacientes (Locatelli *et al.*, 2013). Contudo, resultados do uso de CU de doadores não aparentado não foram satisfatórios como do uso de CU de doadores aparentados (revisado em Hsieh *et al.*, 2011), resultando em elevadas taxas de falha da enxertia e de infecções (que muitas vezes causam a morte dos pacientes, principalmente após uso dos regimes de condicionamento de intensidade reduzida (Locatelli *et al.*, 2003; Kamani *et al.*, 2012; Radhakrishnan *et al.*, 2013).

Estudos avaliando o transplante de células-tronco hematopoéticas com doadores aparentados haploidênticos em pacientes com DF são mais recentes (Bolanos-Meade *et al.*, 2012; Dallas *et al.*, 2013). Bolaños-Meade (2012) demonstraram que o regime de condicionamento não mieloablativo constituído de ATG, ciclofosfamida, fludarabina e irradiação corpórea total seguido de altas doses de ciclosporina A (como profilaxia de DECH) foi seguro, pois nenhum paciente faleceu e nem desenvolveu DECH, porém a taxa de falha da enxertia foi muito elevada (43%). Por outro lado, o trabalho de Dallas

e colaboradores (2013) demonstrou que além de elevada taxa de falha da enxertia (38%), pacientes com DF tratados com o transplante de medula haploidêntico também apresentaram significativas taxas de DECH crônico, o que resultou na morte de 25% dos pacientes (N=2). O transplante de medula utilizando doadores HLA-compatíveis não aparentado após o uso de RIC também foi estudado, porém os resultados não foram tão promissores. Elevadas taxas de DECH crônico foram observadas (62%), resultando na principal causa de morte após o transplante. Dos 8 pacientes faleceram, 7 foram em decorrência do desenvolvimento de DECH (agudo e crônico) e 1 devido a uma infecção após a rejeição do enxerto (Shenoy *et al.*, 2016).

Assim, nosso trabalho e vários outros dados da literatura indicam que o TCTH alogênico de doadores compatíveis aparentado seguido de MAC ainda é a abordagem terapêutica melhor estabelecida no tratamento de pacientes com DF, mostrando-se segura e eficaz. Entretanto, nenhum dos estudos realizados avaliou os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com DF tratados com o TCTH.

Nesses poucos estudos já publicados, a avaliação da reconstituição imunológica de pacientes com DF após o TCTH foi realizada somente durante os primeiros anos (1-2 anos) e foi baseada no estudo de populações celulares gerais, como linfócitos T, linfócitos T CD4, linfócitos T CD8, linfócitos B e células NK (Bhatia *et al.*, 2014; Hsieh *et al.*, 2014; Soni *et al.*, 2014). Assim, nosso trabalho foi o primeiro a avaliar a reconstituição de várias subpopulações celulares em pacientes com DF tratados com o TCTH alogênico por longo seguimento, até 5 anos pós-transplante. Além disso, dividimos os pacientes com DF em grupos segundo parâmetros de resposta clínica (pacientes que perderam o enxerto e que não perderam o enxerto; pacientes que não desenvolveram DECH, pacientes que desenvolveram DECHa e pacientes que desenvolveram DECHc) e comparamos a dinâmica qualitativa e quantitativa da reconstituição imunológica dos grupos.

Parte II – Perfis de reconstituição imunológica de pacientes com DF tratados com TCTH

Nossos dados demonstraram que os pacientes com DF apresentaram padrão geral de reconstituição imunológica de longo termo semelhante ao padrão de reconstituição de outras doenças hematológicas tratadas com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. Estudos demonstraram que enquanto a reconstituição de macrófagos, neutrófilos e NK acontece dentro dos primeiros meses após o transplante, a reconstituição de linfócitos T ocorre em média 100 dias após o transplante (podendo ocorrer mais tarde dependendo do tempo e tipo de tratamento de profilaxia da DECH), enquanto a reconstituição completa de linfócitos B pode demorar até 1-2 anos para acontecer (Auletta e Lazarus, 2005; Geddes e Storek, 2007; Storek *et al.*, 2008; Corre *et al.*, 2010; Darlington *et al.*, 2013).

Pacientes com DF tratados com condicionamento NMA apresentaram redução de linfócitos T, linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 nos primeiros meses após o transplante, porém esses valores foram gradualmente aumentando até 2 anos, atingindo números similares ao pré-transplante (Hsieh *et al.*, 2014). Um trabalho com pacientes com DF tratados com MAC demonstrou que a reconstituição de células B, T e NK foi atingida 9 meses após o transplante (Soni *et al.*, 2014). Somente um trabalho com pacientes com DF tratados com RIC demonstrou que essas células não atingiram os valores basais (ou pré-transplante) até 2 anos pós-TCTH (Bhatia *et al.*, 2014).

Inicialmente, observamos redução de linfócitos totais até 1 ano após o transplante (principalmente de células B de memória), enquanto o número de neutrófilos atingiu valores normais a partir de 3 meses. A reconstituição de células NK também foi rápida (não houve diferença no número dessas células 1 mês após o transplante comparado ao pré-transplante), porém observamos que houve aumento tardio dessas células (a partir de 24 meses após o transplante) principalmente nos pacientes que não perderam o enxerto e nos que não tiveram DECH. Esse retardo da reconstituição ocorreu provavelmente devido a profilaxia da DECH, feita pelo uso de ciclosporina A e metotrexato, que durou até cerca de 1 ano e meio após o transplante. Um estudo *in vitro* demonstrou que tanto a geração como o desenvolvimento de células NK foram afetados após o tratamento com ciclosporina A. Os autores demonstraram que a ciclosporina A inibiu a proliferação de células NK CD56+CD16+ maduras de maneira dose dependente, assim como inibiu a proliferação de células NK não maduras expressando receptores KIR. Contudo, essas células não tiveram sua capacidade de citotoxicidade reduzida, assim como aumentaram a produção de IFN- γ após o tratamento com ciclosporina A (Wang *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho, a reconstituição das células T CD4+ foi mais lenta que a de células T CD8+, resultando na inversão da razão CD4/CD8 até 3 anos após o transplante. Interessantemente,

os números de células T CD4+ se mantiveram reduzidos até 6 meses após o transplante, período em que os números de células RTE e células T CD4+ *naive* também estavam diminuindo, demonstrando a importância do timo na reconstituição das células T CD4. Os números de células T CD8+ *naive* e efectoras também foram reduzidos nos 3 primeiros meses após o TCTH, no entanto não houve alteração no número de células T CD8+ de memória (efetora e central) nesse período, indicando predomínio de células T CD8+ de memória e redução de células T *naive* (principalmente T CD4+) nos meses seguintes ao transplante. Esses dados corroboram dados da literatura que demonstram que as células T CD4+ e CD8+ *naive* reconstituem-se quantitativamente de maneiras diferentes, sendo as células T CD4+ mais dependentes da reativação tímica (Heitger *et al.*, 1997). Durante os primeiros meses após o transplante, quando a produção tímica ainda não é suficiente para reconstituir o *pool* de células T, ocorre expansão periférica de células T induzida por linfopenia (LIP, do inglês *lymphopenia induced proliferation*), principalmente de células T CD8+ de memória. Após esse período, o timo reestabelece sua função e novas células T são produzidas, sobretudo células T CD4+, as quais apresentam números reduzidos, além do fenótipo de memória ou efector nos primeiros meses após o transplante (Storek, Joseph, *et al.*, 2001; Hakim *et al.*, 2005; Geddes e Storek, 2007; Williams *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2009).

Além disso, tem sido descrito que durante a estimulação crônica das células T periféricas, que sobreviveram ao condicionamento e/ou que foram infundidas junto com a medula óssea, nos primeiros meses após o TCTH pode ocorrer uma resposta de células T exacerbada contra antígenos próprios e não próprios, o que pode ser associado às complicações pós-TCTH. Uma forma de regular a expansão de células T (principalmente CD8+ de memória) durante a LIP é pela expressão da molécula PD-1 (Wu *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007).

O PD-1 é um receptor inibitório envolvido com a manutenção da tolerância periférica, sendo que sua expressão em células T e B resulta em um processo chamado de exaustão celular, no qual essas células se tornam não responsivas ao estímulo com antígenos (alógeno ou próprios). Tem sido descrito que o estímulo permanente de células T, como em infecções virais crônicas, resulta na expressão de PD-1 na superfície das células T (principalmente T CD8+) e na manutenção da resposta inflamatória, uma vez que essas células se tornaram incapazes de destruir o vírus (Barber *et al.*, 2006). Da mesma forma, Lin e colaboradores (2007) mostraram que no TCTH, a expressão de PD-1 em células T resultou em exaustão e não resposta ao estímulo antigênico (Lin *et al.*, 2007), sugerindo que o eixo PD-1/PD-L1 apresenta grande importância no controle da resposta de células T após o TCTH.

Interessantemente, observamos que houve redução das células T expressando PD-1 em 1 mês após o transplante somente nos pacientes que tiveram DECHa. Além disso, comparando o grupo com DECHa e sem DECH, as células T (CD4+ e CD8+) PD1+ foram reduzidas no grupo de paciente

que tiveram DECHa, sugerindo importante papel de PD-1 durante os primeiros meses pós-TCTH no controle dessa doença alo-imune decorrente ao TCTH alogênico.

Estudos em modelos animais demonstraram que o PD-1 tem papel fundamental no controle da DECH, uma vez que o bloqueio dessa molécula foi associado com aumento da aloreatividade e da incidência e gravidade da DECH (aguda e crônica) (Blazar *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2013; Fujiwara *et al.*, 2014). A ausência da expressão de PD-1 tanto em células T CD4+ como em células T CD8+ foi associado a sintomas mais graves da DECH, sugerindo o papel do PD-1 no controle da ativação dessas duas subpopulações celulares durante o desenvolvimento da DECH (Blazar *et al.*, 2003). Especificamente, foi demonstrado que o eixo PD-1/PD-1L está envolvido com o controle da DECH, sobretudo devido a ligação de PD-1L expresso nas APC dos animais que receberam o transplante ao PD-1 expresso nas células T CD4+ e CD8+ alogênicas (Saha *et al.*, 2013). Os autores mostraram que o bloqueio do eixo PD-1/PD-1L no modelo animal de DECH resultou no aumento da ativação, proliferação e infiltração das células T CD4+ e CD8+ alogênicas produtoras de IFN- γ e TNF- α sobretudo no trato gastrointestinal (Saha *et al.*, 2013).

Pacientes com diferentes doenças hematológicas malignas que tiveram a recidiva da doença após o transplante vêm sendo tratados com uso do anticorpo monoclonal anti-PD-1. O objetivo desse tratamento é bloquear o sinal inibitório da molécula PD-1, o que resulta na ativação e na proliferação das células T exaustas e na destruição das células tumorais. Contudo, embora o bloqueio do PD-1 seja eficiente no tratamento da recaída após o transplante, ele também foi associado ao desenvolvimento de DECH aguda e/ou crônica (Haverkos *et al.*, 2017; Herbaux *et al.*, 2017; Merryman *et al.*, 2017). Além disso, Herbaux e colaboradores (2017) observaram que os pacientes que desenvolveram DECH após o bloqueio de PD-1 foram aqueles que receberam tratamento nos primeiros meses após o transplante (em média 8,5 meses), enquanto os que não desenvolveram DECH começaram o tratamento em média 28,5 meses após o transplante, sugerindo que o bloqueio precoce dessa molécula pode estar associado ao desenvolvimento da doença. Contudo, a inibição da resposta das células T do doador pela via de sinalização de PD-1 não é suficiente para prevenir o desenvolvimento da DECH sendo necessária a colaboração entre vários mecanismos e células reguladoras para limitar a resposta alogênica após o TCTH (Hossain *et al.*, 2017).

Da mesma forma, o bloqueio do eixo PD-1/PD-1L no modelo animal de transplante de pele resultou na ativação e proliferação das células Th1 alogênicas e na rejeição do enxerto (Sandner *et al.*, 2005). Foi relatado que um paciente teve rejeição do rim transplantado após o tratamento para carcinoma cutâneo utilizando o anticorpo anti-PD-1 (Lipson *et al.*, 2016). Por outro lado, foi demonstrado aumento de células T expressando PD-1 em pacientes com episódios de rejeição aguda de rim. Interessantemente, maior expressão de PD-1 pré-transplante foi associado com maior risco de

rejeição do órgão. Segundo esses autores, maior expressão de PD-1 pré-transplante pode identificar pacientes que com histórico de ativação crônica e com células T reguladoras não funcionais, o que resultaria no desequilíbrio imunológico pós-transplante e rejeição do órgão (Pike *et al.*, 2016). Em nosso trabalho, pacientes que perderam o enxerto tiveram menor número de células TCD8 PD-1+ 12 meses após o transplante, período médio em que ocorreu a falha da enxertia.

Em relação a reconstituição de células B, observamos que reconstituição do número de células B *naïve*, pré-centro germinativo e centrócitos/centroblastos aconteceu dentro dos 3 primeiros meses após o transplante, enquanto reconstituição das células B de memória demorou até 1 ano pós-transplante. Estudos demonstram que após o transplante ocorre o aumento inicial de células B *naïve*, enquanto as células B de memória se reconstituem lentamente, podendo apresentar valores abaixo dos basais até 2 anos pós-transplante (Corre *et al.*, 2010). A reconstituição das células B de memória é mais lenta pois ocorre após a exposição a antígenos (ambiental ou de vacinas) e requer o auxílio de células T CD4 (Mackall *et al.*, 2009). Além disso, o repertório das células B de memória é bastante restrito até um ano após o transplante, sugerindo a expansão clonal dessas células (Omazic *et al.*, 2003). Tem sido demonstrado que células B começam a aumentar a partir de 3 meses após o transplante, porém a maioria dessas células tem fenótipo imaturo (transicional) até cerca de 5 meses em pacientes com diversas doenças hematológicas tratados com o TCTH (Marie-Cardine *et al.*, 2008).

Além disso, a alteração da homeostasia de células B pós-transplante também pode estar associada à ocorrência de DECH aguda e crônica. Foi observado que em pacientes que tiveram DECHa 1 mês e 3 meses após o transplante, o número de precursores de células B na medula óssea foi menor em pacientes com DECHa grau II-IV comparado com pacientes com grau 0-I nos respectivos períodos. Além disso, pacientes que tiveram DECHc grave 1 ano após o transplante também tiveram menor porcentagem de células B precursoras comparado aos pacientes sem DECHc ou com DECHc limitada nesse mesmo período. Esses dados sugerem que a DECH e/ou o seu tratamento podem afetar a produção de células B pela medula óssea após o transplante (Storek, Wells, *et al.*, 2001).

Segundo trabalhos publicados, os números de subpopulações de células B periféricas também são alterados após TCTH alogênico. Os números de células B totais e *naïve* diminuíram 3 e 6 meses após o transplante em pacientes que tiveram DECHa. Em pacientes com DECHc, as células B totais diminuíram em 6 e 24 meses, as células B de memória em 12 e 24 meses e células B *naïve* foram reduzidas até 12 meses após o transplante (Corre *et al.*, 2010). Além disso, a frequência de células B reguladoras e a produção de IL-10 por essas células foi menor nos pacientes que desenvolveram DECHc após o transplante (Khoder *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho, observamos redução do número de células B pré-centro germinativo nos pacientes que tiveram DECHa comparado aos que não tiveram e, ao contrário dos dados da literatura,

observamos o aumento das células B *naive* 3 meses pós-TCTH nos pacientes com DF com DECHa. Entretanto, os números das células B *naive* ativadas, das células B do centro germinativo e das células pós-centro germinativo (de memória) não foram alterados nesses pacientes, indicando que não houve alteração no processo de ativação/diferenciação de células B nos pacientes com DF que desenvolveram DECHa. Assim, estudos adicionais devem ser conduzidos para o esclarecimento do papel das células B (*naive*, de memória e reguladoras) na fisiopatologia da DECH.

No que se refere a reconstituição de células com perfil regulador, embora vários trabalhos demonstrem o papel essencial de células T CD4⁺ reguladoras no estabelecimento da tolerância imunológica após o transplante de medula (Matsuoka *et al.*, 2010; Kielsen *et al.*, 2018), os números dessas células foram reduzidos até 6 meses após o transplante, assim como a produção de TGF- β , nos pacientes com DF tratados com o TCTH. Entretanto, houve aumento do número de células T reguladoras expressando GITR, assim como de células T CD8⁺ reguladoras (CD8⁺CD28⁺CD57⁺ e CD8⁺CD28⁺FOXP3⁺) e de células supressoras derivadas da linhagem mielóides, sugerindo importante papel dessas células na manutenção do equilíbrio imunológico entre células do doador e do receptor em pacientes com DF tratados com o TCTH. Especificamente, diferenças no padrão de reconstituição dessas células reguladoras entre pacientes que perderam o enxerto e o que não perderam e entre pacientes que tiveram DECH e não tiveram DECH também foram encontradas em nosso trabalho.

De fato, observamos aumento das células T CD4⁺CD25^{hi}GITR⁺ nos pacientes com DF a partir de 6 meses após o transplante. Interessantemente, avaliando os pacientes separadamente, foi demonstrado que esse aumento ocorreu sobretudo nos pacientes que não desenvolveram DECH e nos pacientes que não perderam o enxerto. O GITR é um receptor preferencialmente expresso em células T reguladoras (FOXP3⁺), porém não restrito a essas células. Células T CD4⁺ e CD8⁺ efectoras também expressam elevados níveis de GITR após a ativação, enquanto células dendríticas, células B, NK, macrófagos, eosinófilos, basófilos e mastócitos expressam baixos níveis dessa proteína (Mchugh *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2002). Um estudo com camundongos que não expressam GITR em suas células demonstram que a porcentagem de células T reguladoras foi diminuída, enquanto a de outras subpopulações de células T foi normal, sugerindo a importância do GITR no desenvolvimento de células T reguladoras (Stephens *et al.*, 2004).

Contudo, os efeitos da ativação do GITR (através da ligação com seu ligante, GITRL) é bastante complexa e depende do microambiente, do tipo celular (célula T CD4⁺, CD8⁺ ou T reguladora), do nível de ativação das células efectoras e das células T reguladoras e da origem da proteína (animal ou humana) (Muriglan *et al.*, 2004; Tuyaeerts *et al.*, 2007; Ephrem *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a ativação de GITR resulta na ativação e expansão das células T CD4⁺ e CD8⁺ (principalmente CD8⁺), principalmente por induzir o retardo da morte por apoptose,

tornando-as resistentes a supressão por células T reguladoras (Nocentini *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 2004; Igarashi *et al.*, 2008). Entretanto, a função do eixo GITRL/GITR em células T CD4+CD25+ (reguladoras) ainda é contraditória. Alguns estudos *in vitro* demonstram que a ativação do GITR em células T reguladoras aumenta a proliferação, a produção de IL-10 e capacidade supressora dessas células (Andersson *et al.*, 2007; Igarashi *et al.*, 2008), enquanto outros estudos *in vitro* e em modelo animal mostram que a interação do GITR com seu ligante inibe a capacidade supressora das células T reguladoras (Shimizu *et al.*, 2002). Além do mais, a ligação do GITR ao seu agonista em células T reguladoras humanas não inibiu a capacidade supressora dessas células (Tuyaerts *et al.*, 2007).

No contexto do transplante, o eixo GITRL/GITR também não tem funções completamente esclarecidas. A ativação de GITR com seu agonista resultou na inibição da atividade de células T reguladoras e na rejeição aguda do enxerto de pele em animais previamente tolerizado (Bushell e Wood, 2007), assim como o bloqueio da ligação do GITR ao seu ligante favoreceu a atividade de células T reguladoras e a sobrevivência do enxerto no modelo animal de transplante de pele (Kim *et al.*, 2010). Por outro lado, o bloqueio da ligação de GITR ao GITRL levou a redução do número de células T reguladoras e expansão de células T efetoras dentro da córnea, assim como a rejeição do enxerto (Hori *et al.*, 2010). Assim, parece que a ativação de GITR resulta em células T reguladoras com funções diferentes dependendo do contexto/microambiente.

O mesmo pode ser visto no contexto da DECH, na qual a ativação do GITR depende do tipo de DECH e o principal tipo de células T envolvida com a doença. No modelo animal de DECHc, foi demonstrado que injeção do agonista de GITR resultou na destruição de células B, redução de anticorpos anti-DNA circulantes, assim como de sua deposição nos rins, redução da nefropatia e aumento de sobrevivência (Kim *et al.*, 2006). Muriglan e colaboradores demonstraram que a ativação de GITR tem efeitos opostos no controle da resposta alogeneica de células T CD4+ e células T CD8+ na DECH. Enquanto no modelo de DECH induzido somente pela transferência adotiva de células T CD4+ houve redução da morbidade e mortalidade após o tratamento com agonista de GITR, no modelo de DECH induzido pela transferência de células T CD8+ foi visto aumento da morbidade e mortalidade (Muriglan *et al.*, 2004).

De modo geral, tem sido proposto que a ativação de GITR em células T reguladoras causa inibição transiente da sua atividade supressora, porém, ao mesmo tempo, causa a proliferação e expansão dessas células que, em seguida, aumenta em número e recupera sua função supressora (Shevach e Stephens, 2006; Nocentini *et al.*, 2012). Assim, o aumento das células T CD4+CD25hiGITR+ nos pacientes com DF após o transplante pode estar relacionado com maior atividade dessas células, resultando no controle da resposta a aloantígenos e no equilíbrio entre células do doador e do receptor.

Em nosso trabalho, também avaliamos dois tipos de células T CD8⁺ reguladoras, as células T CD8⁺CD28⁺CD57⁺ e as células CD8⁺CD28⁺FOXP3⁺. As células T CD8⁺ de perfil supressor foram identificadas em 1970 por Gershon e colaboradores, porém, estudos que caracterizem melhor essas células e avaliem seus mecanismos de ação dessas células foram recentemente realizados. Nesse sentido, o fenótipo dessas células ainda não está completamente determinado e subpopulações distintas com diferentes mecanismos de ação vêm sendo descritas (revisado em Ligocki e Niederkorn, 2015).

Em relação a subpopulação que expressa CD57, embora em alguns trabalhos sejam descritas apenas como células CD8⁺CD57⁺ e em outros como CD8⁺CD28⁺CD57⁺, trata-se de células senescentes e em expansão oligoclonal resultante da estimulação crônica por antígenos, cujo mecanismo de supressão se dá por meio da produção de fatores solúveis que inibem a atividade citotóxica de células T CD8⁺ e NK (Autran *et al.*, 1991; Sadat-Sowti *et al.*, 1991; Gorochov *et al.*, 1994; Strioga *et al.*, 2011).

O aumento dessas células também foi descrito em pacientes com diferentes doenças hematológicas tratados com o TCTH, assim como pós-transplante de órgãos e em infecções virais crônicas recorrentes (Mollet *et al.*, 1998; Klaus *et al.*, 2003; Sohlberg *et al.*, 2013). No contexto do transplante de medula alogênico, a expansão de células T CD8⁺CD57⁺ após o transplante em pacientes com diversos tipos de leucemia foi associada com menor incidência de recaídas e maior taxa de infecção por CMV (Dolstra *et al.*, 1995).

Observamos aumento das células CD8⁺CD28⁺CD57⁺ a partir de 6 meses após o transplante quando avaliado todos os pacientes juntos. Quando avaliados separadamente, foi demonstrado que o aumento visto após o transplante ocorreu apenas nos pacientes que não perderam o enxerto, os quais apresentaram maior número dessas células comparado aos pacientes que perderam o enxerto, sugerindo importante papel dessas células no estabelecimento da tolerância imunológica entre enxerto e hospedeiro e garantindo a sobrevivência do enxerto nos pacientes com DF transplantados.

Quando avaliadas nos pacientes que desenvolveram DECH (aguda ou crônica) e não desenvolveram, foi demonstrado expansão dessas células CD8⁺CD28⁺CD57⁺ pós-TCTH nos pacientes sem DECH e com DECHa, não havendo diferença entre os grupos. Células T CD8⁺CD57⁺ isoladas de pacientes tratados com TCTH foram capazes de inibir *in vitro* a atividade citolítica de linfócitos alorreativos (de maneira independente de MHC e por meio da produção de um fator solúvel glicosilado de baixo peso molecular (Autran *et al.*, 1991).

Além disso, não observamos aumento dessas células após o transplante nos pacientes que desenvolveram DECHc, apesar de ter sido mostrado que pacientes com DECHc apresentaram maior

número de células T CD8+CD57+, sugerindo papel importante dessas células na fisiopatologia da DECH (Yabe *et al.*, 1990).

Além das células T CD8+CD28-CD57+, investigamos também as células T CD8+CD28-FOXP3+. As células T CD8+CD28- reguladoras induzidas por antígenos são um tipo de células T CD8+ supressora restritas ao MHC de classe I e capazes de suprimir a atividade e proliferação de células T CD4+ antígeno-específicas, sobretudo em reações alogeneicas (Ciubotariu *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2002; Manavalan *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2011). As células T CD8+CD28- suprimem a atividade das células T CD4+ por meio da interação direta com APC que está apresentando o antígeno (tanto para as células TCD4+ como para as TCD8+ reguladoras). Foi demonstrado que após o contato com as células T CD8+CD28- estimuladas com aloantígenos, as APCs aumentam a expressão dos receptores inibitórios ILT3 e ILT4 (transcritos do tipo imunoglobulinas 3 e 4), resultando na diminuição da expressão de moléculas coestimulatórias (como o CD80) na superfície da APC, sobretudo pela inibição da via de NF-κB após a ativação de ILT3. Assim, essas APC que expressam os receptores ILT3 e ILT4 se tornam tolerogênicas, sendo fracas indutoras da ativação das células T CD4+, as quais se tornam anérgicas, podendo até se diferenciar em células T reguladoras (células T reguladoras induzidas)(Chang *et al.*, 2002; Suciu-Foca e Cortesini, 2007; Lerret *et al.*, 2012). Um estudo posterior do mesmo grupo demonstrou que somente a célula T CD8+CD28- que foi estimulada com antígenos expressa Foxp3 e possui atividade supressora, enquanto a célula T CD8+CD28- não primada não expressa Foxp3 e nem propriedade reguladora (Manavalan *et al.*, 2004). Mais uma vez, os autores demonstraram que a célula T CD8+ supressora antígeno-específica induziu a expressão de receptores inibitórios na superfície de células endoteliais (APC não profissionais), tornando-as tolerogênicas, inibindo a aloreatividade e sugerindo importante papel dessas células no estabelecimento do equilíbrio imunológico após transplante de órgãos e de medula (Chang *et al.*, 2002; Manavalan *et al.*, 2004).

Em nosso trabalho, também foi observado aumento das células T CD8+CD28-FOXP3+ após o transplante, porém de maneira mais transiente que as células CD8+CD28-CD57+ (entre 1 e 2 anos). Mais uma vez observamos o aumento dessas células pós-TCTH somente nos pacientes que não perderam o enxerto, embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos, o que sugere importante papel dessas células reguladoras na manutenção do enxerto dos pacientes com DF. Chang e colaboradores (2002) demonstraram que as células T CD8+CD28- isoladas de pacientes que receberam transplante de coração e que não tiveram nenhum episódio de rejeição aguda, quando cultivados com monócitos isolados de biópsias dos seus respectivos doadores (estímulo alogeneico), foram capazes de induzir a expressão de ILT3 e ILT4 nessas células. Já as células T CD8+CD28- isoladas de pacientes que receberam transplante de coração e que tiveram pelo menos um episódio de rejeição aguda não induziram a expressão de ILT3 ou ILT4 nos monócitos derivados dos doadores. De

fato, maior frequência de células CD8+CD28-FOXP3+ foi encontrada na circulação de pacientes que fizeram transplante de coração e que não apresentaram rejeição crônica até 3 anos pós-transplante (Manavalan *et al.*, 2004). Em modelo animal de transplante de coração, foi observado acúmulo de células T CD8+ reguladoras tolerogênicas no aloenxerto e no baço dos animais, o que foi associado com a indução da tolerância e sobrevivência do órgão (Li *et al.*, 2010).

Vale ressaltar também que em modelo animal de alotransplante de pele, foi demonstrado que a transferência adotiva de células T CD8+Foxp3+ induzidas *in vitro* (e do mesmo doador da pele) em animais que receberam aloenxerto de pele foi responsável pela maior sobrevivência do enxerto. Além disso, os autores demonstraram que essas células migraram preferencialmente para os linfonodos drenantes do enxerto, onde essas células suprimiram a proliferação de células T aloespecíficas e induziram a diferenciação das células T CD4+ *naïve* em células T reguladoras (Lerret *et al.*, 2012).

No que se refere à análise dos pacientes com DF que tiveram ou não DECH, observamos a expansão das células T CD8+CD28-Foxp3+ pós-transplante somente nos pacientes que não tiveram DECH, sugerindo o papel dessas células no controle da DECH em paciente com DF. De fato, alguns estudos têm demonstrado o papel das células T CD8+Foxp3+ no controle da resposta inflamatória da DECH. Beres e colaboradores (2012) induziram DECH em camundongos a partir do transplante de medula isolada de camundongos de linhagens diferentes e, portanto, com incompatibilidade de MHC. Nesses animais que tiveram DECH, pode ser observado o aumento de células T CD8+Foxp3+ já nos primeiros 5 dias após o transplante, sobretudo no fígado, baço, pulmão e no cólon intestinal, seguido da diminuição de dessas células 4 semanas após o transplante. Interessantemente, os autores demonstraram que a expansão das células T CD8+Foxp3+ não foi induzida pela linfopenia dos primeiros dias pós-transplante, uma vez que não foi visto aumento dessas células nos animais que tratados com transplante singênico, mas sim pela alorreatividade (Beres *et al.*, 2012). Além disso, foi visto uma correlação positiva entre a incompatibilidade de MHC e indução de células T CD8+Foxp3+. Por fim, os autores demonstraram que as células T CD8+Foxp3+ isoladas de camundongos que tiveram DECH foram capazes de inibir a resposta alogênica de linfócitos *in vitro*, assim como demonstraram que a ausência dessas células foi relacionada com maior severidade dos sintomas clínicos da DECH *in vivo*.

Robb e colaboradores (2012) também demonstraram que ocorreu expansão das células T CD8+FOXP3+ após TCTH alogênico em modelo animal de DECH e mais uma vez que diferenciação foi dependente de aloantígenos, pois essas células não foram vistas no transplante singênico. Também foi descrito que essas células T CD8+FOXP3+ foram mais efetivas na supressão da proliferação e ativação das células T aloespecíficas *in vitro*, sendo considerada uma importante subpopulação celular no controle do desenvolvimento da DECH *in vivo*. Os autores demonstraram também que as células

dendríticas do receptor e a produção de TGF- β são de grande importância para diferenciação dessas células após o transplante (Robb *et al.*, 2012).

Em outro estudo, o qual utilizou um modelo animal humanizado de DECH, foi demonstrado que a transferência adotiva de células T CD8hi reguladoras (FOXP3+ e CTLA-4+) expandidas *in vitro* foi capaz de melhorar os sintomas da DECH por meio da redução da proliferação e ativação de células T alorreativas, resultando na menor produção de citocinas inflamatórias por essas células. O mecanismo de supressão pelas células T CD8hi reguladoras foi antígeno específico (no caso, aloantígeno) e mediado por CTLA-4, uma vez que o bloqueio dessa molécula resultou na perda da capacidade supressora das células T CD8hi reguladoras. O tratamento com as células T CD8hi reguladoras não afetou o desenvolvimento da resposta imunológica a patógenos e nem a atividade do enxerto contra as células neoplásicas. Ao contrário, comparado à célula T CD4+ reguladora, as células T CD8hi reguladoras foram mais eficientes no tratamento da neoplasia, pois essas células, além das propriedades reguladoras, apresentaram atividade citotóxica direta contra as células tumorais (Zheng *et al.*, 2013).

Em nosso trabalho, avaliamos também a reconstituição de outras células supressoras, tais como as MDSC monocíticas e granulocíticas. Nossos resultados demonstraram uma rápida reconstituição das MDSC (monocítica e granulocítica) após o TCTH alogênico nos pacientes com DF. Guan e colaboradores (2015) mostraram que a reconstituição de células MDSC-M e MDSC-G ocorre durante os primeiros 15 dias pós-transplante alogênico, sendo a reconstituição de MDSC-G ligeiramente mais lenta que a de MDSC-M durante o primeiro mês (Guan *et al.*, 2015). Não observamos essa diferença entre o perfil de reconstituição das duas células, pois começamos a avaliar a reconstituição dessas células a partir de 1 mês pós-transplante, quando essas já tinha atingindo valores iguais (e até maiores) que o pré-transplante.

Além da rápida reconstituição pós-transplante, observamos aumento das MDSC-M 1 mês após o transplante nos pacientes que não perderam o enxerto, comparado ao período pré-transplante. Também vimos que a frequência dessas células foi maior no grupo que teve enxertia comparado ao grupo que perdeu o enxerto, sugerindo função importante das MDSC-M no controle da resposta imunológica contra o enxerto. Trabalhos com animais e humanos vêm demonstrando grande importância das MDSC em humanos no controle da resposta imunológica contra órgãos transplantados, como coração, rins e pele (Dugast *et al.*, 2008; Adeegbe *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2014; Nakamura *et al.*, 2015). Embora ainda existam poucos trabalhos que avaliaram o papel das MDSC no contexto da enxertia de medula óssea, tem sido demonstrado que maior quantidade de MDSC-M no enxerto de pacientes com diversas doenças hematológica tratados com o TCTH foi relacionada aos melhores resultados clínicos pós-transplante (Yin *et al.*, 2016). A sobrevida de pacientes que

receberam enxerto com maior quantidade de MDSC foi de 100%, enquanto que a sobrevivência de pacientes que receberam menor dose foi de 50%. A incidência cumulativa de recaídas em 2 anos após o transplante foi de 6,25% e 29,25% nos pacientes que receberam altas e baixas doses de MDSC, respectivamente (Yin *et al.*, 2016).

Em nosso trabalho, houve expansão das células MDSC-M e MDSC-G 1 mês pós-transplante (comparado ao pré-transplante) somente no grupo de pacientes que desenvolveram DECHa, corroborando dados da literatura que demonstram expansão de MDSC pós-transplante em pacientes com DECHa e o papel fundamental dessas células no controle da doença aloimune. Lv e colaboradores (2015), reportaram aumento da frequência das MDSC-M 30 dias após o transplante nos pacientes com DECHa comparado aos pacientes que não tiveram DECHa. Interessantemente, foi visto que 15 dias após o transplante pacientes que não tiveram DECHa tiveram maior nível de MDSC-M comparado aos que tiveram DECHa e que baixa porcentagem de MDSC-M 15 dias após o transplante foi associado com alto risco de DECHa. Além disso, pacientes que tiveram DECHa e foram responsivos ao tratamento, apresentaram aumento da frequência de MDSC durante o tratamento seguido da diminuição dessas células (Lv *et al.*, 2015).

Outro trabalho reportou que pacientes com diversas doenças hematológicas tratados com o transplante alogênico apresentaram aumento da frequência de MDSC-M até 6 meses após o transplante, sobretudo os pacientes que tiveram DECH aguda (grau 2-3) (Mougiakakos *et al.*, 2013). O aumento dessas células foi diretamente relacionado ao aumento dos níveis séricos de IL-6, G-CSF e IL-10 (Mougiakakos *et al.*, 2013), o que não pode ser observado em nosso trabalho, pois os níveis plasmáticos dessas citocinas foram muito baixos em nossos pacientes e não puderam ser analisadas e nem correlacionados com o desenvolvimento de DECH e/ou expansão de MDSC. Ainda nesse mesmo trabalho, foi mostrado que a maioria das MDSC foi originária do doador e que as células T dos pacientes transplantados apresentaram menor capacidade de proliferação *in vitro* e menor expressão da cadeia CD3 ζ comparada aos indivíduos saudáveis, as quais foram aumentadas após o bloqueio da atividade da IDO das células MDSC-M.

Recentemente, Yin e colaboradores mostraram que pacientes com maior frequência de MDSC-M no momento da enxertia apresentaram menor incidência de DECHa assim como os sintomas mais brandos da doença. Nesse mesmo trabalho, foi visto que a frequência dessas células foi maior nos pacientes que desenvolveram DECHa comparado aos que não desenvolveram após o transplante. Nesses pacientes, a porcentagem de MDSC-M diminuiu após o transplante até o momento do desenvolvimento da DECHa, quando então houve aumento dessas células, seguida da diminuição após o tratamento e cura dos sintomas da DECHa. Maior concentração de citocinas inflamatórias foi detectada nos pacientes com DECH, assim como maiores níveis dessas citocinas foram associados à

maior frequência de MDSC-M, sugerindo que a expansão das células MDSC é ditada pelo grau da inflamação (Yin *et al.*, 2016). Ademais, foi encontrado, em modelo animal de câncer, que as MDSC-M possuem maior potencial supressor que as MDSC-G (Haverkamp *et al.*, 2014).

Além do padrão de reconstituição das células MDSC afetar o desenvolvimento da DECH, estudos vêm demonstrando que a frequência dessas células na medula do doador também pode influenciar o desenvolvimento de DECH após o transplante (Vendramin *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2016). Maiores quantidades de MDSC-M no enxerto foi associado com menor risco de desenvolvimento de DECH aguda e menor grau de severidade da doença (não foi vista correlação com a incidência de DECH crônica) (Vendramin *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016).

Foi descrito que o mecanismo pelo qual as MDSC induzem a tolerância imunológica após o transplante é dependente do contato com células iNKT e T reguladoras (Hongo *et al.*, 2014; Schneidawind *et al.*, 2015). Van Der Merwe e colaboradores (2013) demonstraram que o mecanismo de ação iNKT na prevenção da DECH é bastante complexo e dependente da interação dessas células com as MDSC. Embora não seja totalmente esclarecido, este trabalho sugere que, durante o regime de condicionamento, as células iNKT são induzidas a produzir IL-4, o que é capaz de ativar e expandir as MDSC. Uma vez estimuladas, as MDSC induzem a proliferação de células Treg, por meio de um mecanismo dependente da interação PD-1/PD-L1 (Van Der Merwe *et al.*, 2013).

Recentemente, foi mostrado que as células iNKT têm grande importância para o controle da DECH após o TCTH em animais e em pacientes com diferentes doenças hematológicas. Em estudos com modelos animais, foi observado que tanto as células iNKT dos doadores como as dos receptores da medula óssea desempenham papel importante no controle da DECH (Lan *et al.*, 2003; Schneidawind *et al.*, 2014). No trabalho de Lan e colaboradores (2003), foi visto que as células iNKT do próprio animal que recebeu o TCTH foram responsáveis pelo controle do desenvolvimento da DECH. Por outro lado, Schneidawind e colaboradores (2014) mostraram que a transferência adotiva de células iNKT enriquecidas a partir do camundongo doador da medula óssea protegeu o animal do desenvolvimento da DECH, sobretudo pela inibição da proliferação e ativação de células T, aumento de citocinas séricas de padrão Th2 nos animais tratados e expansão de células Treg (Schneidawind *et al.*, 2014). Recentemente, Schneidawind e colaboradores (2015) mostraram que a transferência adotiva de células iNKT de um animal de linhagem diferente da linhagem do doador e do receptor (*third-party*) também foi capaz de proteger o desenvolvimento da DECH por meio dos mesmos mecanismos que as células iNKT do doador, indicando que essa função de imunorregulação independe da compatibilidade do MHC.

Além disso, foi demonstrado que os pacientes que reconstituíram maior número de células iNKT (provenientes dos doadores) durante os primeiros 15 dias após o transplante apresentaram

menor incidência de DECH (Rubio *et al.*, 2012). Contudo, em nosso trabalho, observamos aumento do número de iNKT 3 e 36 meses após o transplante nos pacientes com DECHa comparado aos pacientes que não desenvolveram DECH. Houve também aumento das células iNKT 3 meses após o TCTH nos pacientes que perderam o enxerto comparado aos que não perderam.

Recentemente, Hongo e colaboradores reportaram que o regime de condicionamento que combina irradiação linfóide total e ATG seguido do transplante de células-tronco hematopoéticas foi eficiente na indução do equilíbrio imunológico em animais que receberam transplante de coração. Nesse trabalho, foi visto que a não rejeição do órgão foi dependente da interação entre células dendríticas CD8+ e das células iNKT, pois animais deficientes dessas duas células rejeitaram o órgão até 90 dias após o transplante (Hongo *et al.*, 2017). Células dendríticas tolerogênicas (geradas após o condicionamento) interagem com células iNKT possivelmente pela ligação dos receptores PD-L2 e Rae-1 ao receptores PD-1 e NKG2D expressos nas células iNKT aumentando a produção IL-4 pelas iNKT, o que resulta na ativação de células Treg e MDSC (Hongo *et al.*, 2017).

Paralelamente à reconstituição das células, também quantificamos biomarcadores da DECH no plasma de pacientes com DF tratados com o TCTH. O trabalho de Paczesny e colaboradores (2009) foi o primeiro estudo a descrever um painel de 4 biomarcadores prognósticos da DECHa, evidenciando forte associação entre IL-2R α (CD25), TNFR1, IL-8 e HGF e o desenvolvimento da doença. Baseado nisso, em nosso trabalho avaliamos os níveis plasmáticos de (CD25), IL-8 e HGF no soro dos pacientes com DF antes e após o transplante, contudo os níveis de IL-8 foram muito baixos e não puderam ser avaliados. O IL-2R α é um receptor essencial para ativação de células T (Liao *et al.*, 2013) e foi descrito como o melhor biomarcador da DECH (Paczesny *et al.*, 2009). O HGF é uma proteína envolvida com o reparo tecidual, atuando em células epiteliais, endoteliais e hematopoéticas (Kmieciak *et al.*, 1992; Kawaida *et al.*, 1994; Ohmichi *et al.*, 1996) e acredita-se que ela seja liberada pelo órgãos lesionados na DECH, principalmente pelo fígado (Okamoto *et al.*, 2001; Paczesny *et al.*, 2009).

Após o transplante, houve aumento dos níveis de CD25 até 24 meses e diminuição de HGF 1-2 anos. Porém, quando esses marcadores foram avaliados separadamente nos pacientes com DECHa e sem DECH, observamos que o aumento de CD25 foi prolongado pós-transplante nos pacientes com DECHa (até 6 meses no grupo ausência DECH e até 2 anos no grupo DECHa) e que aumento de HGF após o transplante (1 mês) ocorreu somente nos pacientes com DECHa. Ademais, os níveis de CD25 foram maiores 6 meses pós-transplante nos pacientes com DECHa comparado aos sem DECH, corroborando dados da literatura que demonstram aumento da concentração dessas moléculas em pacientes com DECH. Interessantemente, os níveis de HGF foi maior nos pacientes pré-transplante comparado aos indivíduos sadios, provavelmente devido ao processo de inflamação crônica característico da DF, o qual resulta em dano tecidual de diversos tecidos.

Também avaliamos os níveis plasmáticos de outros fatores e citocinas associados ao desenvolvimento da DECHa, como o ST2, Reg3- α , IL-22, BAFF, APRIL, IL-15 e IL-21.

O ST2 (receptor de IL-33) foi descrito como importante marcador de severidade da DECH, estando associado à resistência ao tratamento assim como com maior mortalidade (Vander Lugt *et al.*, 2013). Posteriormente, em um estudo com animais, foi demonstrado que o ST2 solúvel além de ser um indicador de dano tecidual causado pelo condicionamento, também funciona como um ligante de IL-33, impedindo que essa citocina se ligue ao ST2 expresso na superfície das células T (sobretudo Th1) que estão envolvidas com a destruição tecidual que ocorre na DECH. Nesse estudo, foi descrito que após o condicionamento há grande produção de IL-33 no intestino e essa citocina se liga ao seu receptor (ST2) presente nas células T e induzem a produção de TNF- α por essas células, resultando no agravamento dos sintomas da DECH (Reichenbach *et al.*, 2015).

Os níveis de ST2 aumentaram pós-transplante nos pacientes com DF que tiveram DECHa, enquanto que diminuíram nos pacientes sem DECH, embora não tenha sido observado diferença na concentração de ST2 entre os grupos, provavelmente devido ao fato de os pacientes do nosso estudo não terem desenvolvido os sintomas mais graves da DECH. Também é importante ressaltar que a dosagem dessas proteínas foi feita a partir de 1 mês após o transplante e um estudo indica que os elevados níveis de ST2 associados à elevada taxa de mortalidade foram detectados no plasma dos pacientes 14 dias após TCTH (Vander Lugt *et al.*, 2013).

Outra molécula, a Reg3- α , é uma lectina antimicrobiana secretada pelas células de Paneth, foi apontada como um importante marcador de DECHa do trato gastrointestinal. Maiores níveis de Reg3- α no diagnóstico da doença foi associado a maior severidade e maior resistência ao tratamento da DECH (Ferrara *et al.*, 2011). Em nosso trabalho, a concentração de Reg3- α aumentou após o transplante nos pacientes com DECHa e sem DECH, não havendo diferença entre os grupos provavelmente pelo fato de poucos pacientes com DF terem desenvolvido DECHa no trato gastrointestinal, uma vez que a maioria teve DECHa de pele.

A IL-22 é uma citocina de função pleiotrópica, ou seja, pode ter efeitos anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios dependendo do microambiente. De modo geral, a IL-22 é uma citocina essencial para manutenção da integridade da barreira epitelial (pele e intestino), assim como para a regeneração tecidual após diferentes tipos de lesão, porém também pode apresentar característica patogênica, intensificando a resposta inflamatória como na psoríase e artrite reumatoide (Lamarthee *et al.*, 2016). Alguns trabalhos com animais e humanos demonstraram um aumento de células T que expressam IL-22 na DECH (Bruggen *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Tumino *et al.*, 2015), assim como o agravamento da doença em animais tratados com IL-22 durante o TCTH (Zhao *et al.*, 2014). Entretanto, o tratamento com IL-22 após 7 dias do transplante resultou em aumento da regeneração do tecido intestinal,

redução da lesão tecidual e redução da taxa de mortalidade dos animais com DECH. Em nosso trabalho, os pacientes com DECHa apresentaram aumento tardio de IL-22 (2 anos após o transplante) comparado ao pré e ao grupo ausência DECH, o que pode estar associado ao processo de regeneração tecidual após o tratamento e cura da DECH.

O BAFF é uma proteína associada principalmente a DECHc por induzir a expansão de células B, assim como a produção de anticorpos por essas células (revisado em Sarantopoulos *et al.*, 2015). A avaliação de pacientes tratados com TCTH demonstrou que houve aumento de BAFF após o TCTH em pacientes que desenvolveram e não desenvolveram DECHc, porém a concentração de BAFF foi gradualmente diminuindo conforme o número de células B foi aumentando em pacientes que não tiveram DECHc. Entretanto, nos pacientes que desenvolveram DECHc elevados níveis de BAFF foram persistentes e associados ao retardo da reconstituição de células B, sobretudo de células B *naïve* (Sarantopoulos *et al.*, 2007; Jacobson *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, os níveis de BAFF aumentaram após o transplante nos pacientes que não desenvolveram DECH e nos que tiveram DECHa e DECHc (apenas aos 3 meses). Contudo, não observamos aumento persistente de BAFF após o transplante nos pacientes que tiveram DECHc, assim como não observamos diferenças nos níveis dessa proteína quando comparado os grupos.

Além do BAFF, o April é outro fator envolvido com o desenvolvimento de células B e também descrito em pacientes com DECHc. Elevados níveis de April foram descritos em pacientes com DECHc comparado à indivíduos saudáveis, sobretudo naqueles com a forma ativa da doença. Nos pacientes com DECHc, os níveis séricos de April foram correlacionados com a frequência de plasmablastos, produção de anticorpo e severidade da doença (Chasset *et al.*, 2016). Em nosso trabalho, a concentração de April foi maior 1 mês pós-TCTH nos pacientes com DECHa comparado com os pacientes sem DECH, sendo que os níveis de April diminuíram nos pacientes sem DECH após o transplante.

Thiant e colaboradores (2011) reportaram aumento de IL-15 e IL-7 cerca de 30 dias após o transplante em pacientes que desenvolveram DECHa. Em camundongos, a expressão e produção de IL-15 pelas células da medula óssea do doador resultou na expansão de células T CD8 de memória efetora e sintomas mais graves da DECH. Entretanto, contraditoriamente, 7 dias após o transplante, pacientes com baixas concentrações de IL-15 tiveram mais chances de desenvolver DECHc. Em nosso trabalho, a concentração de IL-15 aumentou pós-TCTH nos pacientes com DECHa. Além disso, 1 mês pós-transplante, os níveis de IL-15 maiores nos pacientes com DECHa comparado aos que não desenvolveram DECH.

É importante ressaltar que muitos marcadores avaliados em nossos pacientes não puderam ser detectados, o que impediu a correlação entre os resultados da expressão gênica e as citocinas inflamatórias presentes no plasma, assim como a correlação entre as diferentes subpopulações

celulares descritas e a produção de citocinas. Além disso, o número de pacientes com DECHc foi muito reduzido em nosso trabalho, com alguns períodos pós-transplante apresentando N menor que 3, impossibilitando a análise estatística da reconstituição imunológica e hematológica. Ademais, estudos adicionais confirmando a função das células reguladoras identificadas nesse trabalho como possíveis mediadoras da tolerância imunológica são de grande importância para o maior esclarecimento dos mecanismos envolvidos na manutenção do enxerto e no controle do desenvolvimento da DECH.

Por fim, nossos dados constituem um trabalho inédito e pioneiro na área de transplantes e terapia celular, no qual as análises laboratoriais permitiram a identificação de diferentes perfis de reconstituição imunológico, bem como de alguns biomarcadores de resposta terapêutica, o que poderá resultar, futuramente, no aprimoramento de terapias para o melhor tratamento dos pacientes com doenças falciformes.

7 Resumo dos resultados obtidos

1. O TCTH alogênico seguido do regime de condicionamento mieloablativo foi eficaz no tratamento dos pacientes com DF, mesmo nos pacientes mais velhos.
2. O TCTH alogênico foi capaz de modular e diminuir a resposta inflamatória crônica, característica dos pacientes com DF.
3. Após o TCTH alogênico, houve redução da expressão de moléculas de adesão nas células vermelhas (hemácias e reticulócitos), da frequência de reticulócitos e da porcentagem de hemoglobina S.
4. Foi observada redução de níveis plasmáticos de VCAM-1, IL-18, MIP-1 α e MIP-1 β após o TCTH alogênico nos pacientes com DF.
5. A maioria dos pacientes com DF apresentou quimerismo misto de células nucleadas após o transplante e se mantiveram como quimeras mistas até 5 anos após o transplante.
6. Após o TCTH alogênico, os pacientes com DF não desenvolveram a forma mais severa da DECH (aguda ou crônica). Os pacientes que desenvolveram DECH tiveram a forma leve da doença sendo todos facilmente tratados.
7. Pacientes com DF apresentaram padrão de reconstituição imunológica comum ao descrito na literatura de pacientes com diversas doenças hematológicas tratados com o TCTH alogênico.
8. Pacientes com DF que perderam o enxerto após o transplante apresentaram menor número de células T CD8+PD-1+ exaustas 12 meses após o transplante, comparado aos pacientes que não perderam o enxerto.
9. Pacientes com DF que perderam o enxerto após o transplante apresentaram menor número de células T CD8+CD28-CD57+ reguladoras 24 meses após o transplante comparado aos pacientes que não perderam o enxerto.
10. Pacientes com DF que perderam o enxerto após o transplante apresentaram maior frequência de MDSC-M 1 mês após o TCTH, comparado aos pacientes que não perderam o enxerto.
11. Pacientes com DF que perderam o enxerto após o transplante apresentaram maior número de células iNKT 3 meses após o transplante, comparado aos pacientes que não perderam o enxerto;
12. Foi observado aumento de células T reguladoras (células T CD4+CD25^{hi}GITR⁺, T CD8+CD28-CD57+ e T CD8+CD28-FOXP3+) após o transplante em pacientes que não perderam o enxerto, comparado ao período pré-transplante.
13. Pacientes com DF que desenvolveram DECHa apresentaram menor número de células T CD4+PD-1+ e CD8+PD-1+ exaustas 1 mês após o TCTH, comparado aos pacientes que não tiveram DECH.

14. Pacientes com DF que desenvolveram DECHa apresentaram aumento de células iNKT 3 meses após o transplante, comparado aos pacientes que não tiveram DECH.
15. Pacientes com DECHa tiveram expansão de MDSC-M e MDSC-G 1 mês após o transplante, comparado ao período pré-transplante.
16. Houve aumento de células T de perfil regulador (células T CD4+CD25hiGITR+ e T CD8+CD28-FOXP3+) após o TCTH nos pacientes que não desenvolveram DECH, comparado ao pré-transplante.
17. Biomarcadores da DECH, como IL-15, IL-22, APRIL, HGF e ST2 foram aumentados no plasma dos pacientes com DECHa após o transplante comparado ao pré-transplante.
18. O nível de CD25 (IL2R α) plasmático aumentou após o transplante nos pacientes com DECHa e sem DECH, porém apresentou concentração mais elevada nos pacientes com DECHa.
19. Pacientes com DF que responderam ao TCTH, com melhora clínica, redução da inflamação crônica sem desenvolvimento de DECH e sem falha da enxertia, apresentaram expansão de células T reguladoras (células T CD4+CD25hiGITR+, T CD8+CD28-CD57+ e T CD8+CD28-FOXP3+) e de células T exaustas durante a reconstituição imunológica, sugerindo uma função importante dessas células no estabelecimento da tolerância imunológica duradoura após o TCTH alogênico nesses pacientes.

Conclusão

8 Conclusão

O TCTH alogênico é uma abordagem terapêutica eficaz para pacientes com DF. Mesmo nos pacientes que não apresentaram quimerismo total, o transplante levou à redução da resposta inflamatória crônica, da expressão de moléculas de adesão nas células vermelhas, da frequência de reticulócitos e da hemoglobina S. Pacientes com DF que responderam ao TCTH, com melhora clínica, redução da inflamação crônica, sem desenvolvimento de DECH e sem falha da enxertia, apresentaram expansão de células T de perfil regulador e de células T exaustas durante a reconstituição imunológica, sugerindo uma função importante dessas células no estabelecimento da tolerância imunológica duradoura após o TCTH alogênico nesses pacientes.

Referências Bibliográficas

- ABRAHAM, A.; JACOBSON, D. A.; BOLLARD, C. M. Cellular therapy for sickle cell disease. **Cytotherapy**, v. 18, n. 11, p. 1360-1369, Nov 2016. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.06.011> >.
- ADEEGBE, D. et al. In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4(+)Foxp3(+) T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. **Cell Transplant**, v. 20, n. 6, p. 941-54, 2011. ISSN 0963-6897. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3727/096368910x540621> >.
- AKINSHEYE, I.; KLINGS, E. S. Sickle cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. **J Cell Physiol**, v. 224, n. 3, p. 620-5, Sep 2010. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20578237> >.
- ALEXANDER, T. et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. **Blood**, v. 113, n. 1, p. 214-23, Jan 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824594> >.
- ALPDOGAN, O.; VAN DEN BRINK, M. R. Immune tolerance and transplantation. **Semin Oncol**, v. 39, n. 6, p. 629-42, Dec 2012. ISSN 1532-8708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23206840> >.
- ANDERSSON, J. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells are activated in vivo by recognition of self. **Int Immunol**, v. 19, n. 4, p. 557-66, Apr 2007. ISSN 0953-8178 (Print)0953-8178. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxm021> >.
- ANYAEGBU, C. C. et al. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia (SCA). **Eur J Haematol**, v. 60, n. 4, p. 267-8, Apr 1998. ISSN 0902-4441 (Print)0902-4441. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ASHLEY-KOCH, A. E. et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5721-6, Jun 15 2008. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-02-074849> >.
- AULETTA, J. J.; LAZARUS, H. M. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. **Bone Marrow Transplant**, v. 35, n. 9, p. 835-57, May 2005. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778723> >.
- AUTRAN, B. et al. A soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. **Blood**, v. 77, n. 10, p. 2237-41, May 15 1991. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- BAKANAY, S. M. et al. Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 545-7, Jan 15 2005. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-01-0322> >.

BALLESTER, O. F.; ABDALLAH, J. M.; PRASAD, A. S. Impaired IgM antibody responses to an influenza virus vaccine in adults with sickle cell anemia. **Am J Hematol**, v. 20, n. 4, p. 409-12, Dec 1985. ISSN 0361-8609 (Print)0361-8609. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BARAO, I. et al. Suppression of natural killer cell-mediated bone marrow cell rejection by CD4+CD25+ regulatory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 14, p. 5460-5, Apr 4 2006. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509249103> >.

BARBER, D. L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 682-7, Feb 9 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature04444> >.

BELISARIO, A. R. et al. Reticulocyte count is the most important predictor of acute cerebral ischemia and high-risk transcranial Doppler in a newborn cohort of 395 children with sickle cell anemia. **Ann Hematol**, v. 95, n. 11, p. 1869-80, Oct 2016. ISSN 0939-5555. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-016-2789-5> >.

BERES, A. J.; DROBYSKI, W. R. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. **Front Immunol**, v. 4, p. 163, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805140> >.

BERES, A. J. et al. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells are induced during graft-versus-host disease and mitigate disease severity. **J Immunol**, v. 189, n. 1, p. 464-74, Jul 1 2012. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200886> >.

BERNAUDIN, F. et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2749-56, Oct 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17606762> >.

_____. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1130-40; quiz 1436, Jan 27 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-06-293514> >.

BHATIA, M. et al. Reduced toxicity, myeloablative conditioning with BU, fludarabine, alemtuzumab and SCT from sibling donors in children with sickle cell disease. **Bone Marrow Transplant**, v. 49, n. 7, p. 913-20, Jul 2014. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2014.84> >.

BHATIA, M.; SHETH, S. Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease: patient selection and special considerations. **J Blood Med**, v. 6, p. 229-38, 2015. ISSN 1179-2736. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2147/jbm.s60515> >.

BJORNSON, A. B.; LOBEL, J. S. Direct evidence that decreased serum opsonization of *Streptococcus pneumoniae* via the alternative complement pathway in sickle cell disease is related to antibody deficiency. **J Clin Invest**, v. 79, n. 2, p. 388-98, Feb 1987. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci112824> >.

BLAZAR, B. R. et al. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 171, n. 3, p. 1272-7, Aug 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BLAZAR, B. R.; MURPHY, W. J.; ABEDI, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 6, p. 443-58, Jun 2012. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri3212> >.

BOLANOS-MEADE, J. et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation with posttransplant cyclophosphamide expands the donor pool for patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 120, n. 22, p. 4285-91, Nov 22 2012. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-07-438408> >.

BOOTH, C.; INUSA, B.; OBARO, S. K. Infection in sickle cell disease: a review. **Int J Infect Dis**, v. 14, n. 1, p. e2-e12, Jan 2010. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19497774> >.

BRENDEL, C. et al. Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. **J Clin Invest**, v. 126, n. 10, p. 3868-3878, Oct 03 2016. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci87885> >.

BRITTAİN, J. E. et al. Mechanism of CD47-induced $\alpha 4 \beta 1$ Integrin Activation and Adhesion in Sickle Reticulocytes. 2004-10-08 2004. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/279/41/42393.short> >.

_____. Activation of sickle red blood cell adhesion via integrin-associated protein/CD47–induced signal transduction. In: (Ed.). **J Clin Invest**, v.107, 2001. p.1555-62. ISBN 0021-9738 (Print).

BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. **Br J Haematol**, v. 166, n. 2, p. 165-76, Jul 2014. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12950> >.

BRUGGEN, M. C. et al. Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease. **Blood**, v. 123, n. 2, p. 290-9, Jan 9 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-07-514372> >.

BUSHELL, A.; WOOD, K. GITR ligation blocks allograft protection by induced CD25+CD4+ regulatory T cells without enhancing effector T-cell function. **Am J Transplant**, v. 7, n. 4, p. 759-68, Apr 2007. ISSN 1600-6135 (Print)1600-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01716.x> >.

CAHN, J. Y. et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1495-500, Aug 15 2005. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-11-4557> >.

CARTRON, J. P.; ELION, J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. **Transfus Clin Biol**, v. 15, n. 1-2, p. 39-50, Feb-Mar 2008. ISSN 1246-7820 (Print)1246-7820. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.traccli.2008.05.001> >.

CASTRO, O. et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 84, n. 2, p. 643-9, Jul 15 1994. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CAVAZZANA, M.; ANTONIANI, C.; MICCIO, A. Gene Therapy for beta-Hemoglobinopathies. **Mol Ther**, v. 25, n. 5, p. 1142-1154, May 03 2017. ISSN 1525-0016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.024> >.

CHANG, C. C. et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. **Nat Immunol**, v. 3, n. 3, p. 237-43, Mar 2002. ISSN 1529-2908 (Print)1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni760> >.

CHARACHE, S. et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, n. 10, p. 2555-65, May 15 1992. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **N Engl J Med**, v. 332, n. 20, p. 1317-22, May 18 1995. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199505183322001> >.

CHASSET, F. et al. APRIL levels are associated with disease activity in human chronic graft-versus-host disease. In: (Ed.). **Haematologica**. Italy, v.101, 2016. p.e312-5. ISBN 1592-8721 (Electronic)0390-6078 (Linking).

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v. 64, n. 1, p. 72-80, Jan 2012. ISSN 1521-6551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131167> >.

CHOU, S. T.; FASANO, R. M. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 591-608, Jun 2016. ISSN 0889-8588. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2016.01.011> >.

CITA, K. C. et al. Association of adenylyl cyclase 6 rs3730070 polymorphism and hemolytic level in patients with sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 58, p. 21-5, May 2016. ISSN 1079-9796. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.02.006> >.

CIUBOTARIU, R. et al. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. **J Immunol**, v. 161, n. 10, p. 5193-202, Nov 15 1998. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CONRAN, N. et al. Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. **Am J Hematol**, v. 76, n. 4, p. 343-7, Aug 2004. ISSN 0361-8609 (Print)0361-8609. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.20129> >.

CORRE, E. et al. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. **Haematologica**, v. 95, n. 6, p. 1025-9, Jun 2010. ISSN 0390-6078. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2009.018853> >.

CROCCHIOLO, R. et al. HLA matching affects clinical outcome of adult patients undergoing haematopoietic SCT from unrelated donors: a study from the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo and Italian Bone Marrow Donor Registry. **Bone Marrow Transplant**, v. 44, n. 9, p. 571-7, Nov 2009. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2009.67> >.

DALLAS, M. H. et al. Long-term outcome and evaluation of organ function in pediatric patients undergoing haploidentical and matched related hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 19, n. 5, p. 820-30, May 2013. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.02.010> >.

DARLINGTON, P. J. et al. Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation. **Ann Neurol**, v. 73, n. 3, p. 341-54, Mar 2013. ISSN 1531-8249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463494> >.

DEBAUN, M. R. et al. Silent cerebral infarcts: a review on a prevalent and progressive cause of neurologic injury in sickle cell anemia. 2012-05-17 2012. Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/119/20/4587.long?sso-checked=true> >.

_____. Controlled trial of transfusions for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. **N Engl J Med**, v. 371, n. 8, p. 699-710, Aug 21 2014. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1401731> >.

DOLSTRA, H. et al. Expansion of CD8+CD57+ T cells after allogeneic BMT is related with a low incidence of relapse and with cytomegalovirus infection. **Br J Haematol**, v. 90, n. 2, p. 300-7, Jun 1995. ISSN 0007-1048 (Print)0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DOS SANTOS, J. L. et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. part II: furoxan derivatives. **J Med Chem**, v. 55, n. 17, p. 7583-92, Sep 2012. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889416> >.

_____. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. **J Med Chem**, v. 54, n. 16, p. 5811-9, Aug 2011. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21766854> >.

DUGAST, A. S. et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. **J Immunol**, v. 180, n. 12, p. 7898-906, Jun 15 2008. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DWORKIS, D. A. et al. Severe sickle cell anemia is associated with increased plasma levels of TNF-R1 and VCAM-1. **Am J Hematol**, v. 86, n. 2, p. 220-3, Feb 2011. ISSN 0361-8609. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21928> >.

EPHREM, A. et al. Modulation of Treg cells/T effector function by GITR signaling is context-dependent. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 9, p. 2421-9, Sep 2013. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201343451> >.

FERNANDES, Q. Therapeutic strategies in Sickle Cell Anemia: The past present and future. **Life Sci**, v. 178, p. 100-108, Jun 01 2017. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.03.025> >.

FERRARA, J. L. et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. **Blood**, v. 118, n. 25, p. 6702-8, Dec 15 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-375006> >.

_____. Graft-versus-host disease. **Lancet**, v. 373, n. 9674, p. 1550-61, May 2 2009. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(09\)60237-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(09)60237-3) >.

FLANAGAN, J. M. et al. Hydroxycarbamide alters erythroid gene expression in children with sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v. 157, n. 2, p. 240-8, Apr 2012. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09061.x> >.

FOWLER, D. H.; GRESS, R. E. Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma. **Leuk Lymphoma**, v. 38, n. 3-4, p. 221-34, Jul 2000. ISSN 1042-8194 (Print)1026-8022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10428190009087014> >.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v. 117, n. 4, p. 850-8, Apr 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404610> >.

FUJIWARA, H. et al. Programmed death-1 pathway in host tissues ameliorates Th17/Th1-mediated experimental chronic graft-versus-host disease. **J Immunol**, v. 193, n. 5, p. 2565-73, Sep 1 2014. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1400954> >.

GANDY, K. L. et al. CD8+TCR+ and CD8+TCR- cells in whole bone marrow facilitate the engraftment of hematopoietic stem cells across allogeneic barriers. **Immunity**, v. 11, n. 5, p. 579-90, Nov 1999. ISSN 1074-7613 (Print)1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GEDDES, M.; STOREK, J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 20, n. 2, p. 329-48, Jun 2007. ISSN 1521-6926. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448965> >.

GLUCKMAN, E. et al. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 129, n. 11, p. 1548-1556, Mar 16 2017. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-10-745711> >.

GLUCKSBERG, H. et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. **Transplantation**, v. 18, n. 4, p. 295-304, Oct 1974. ISSN 0041-1337 (Print)0041-1337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOROCHOV, G. et al. Oligoclonal expansion of CD8+ CD57+ T cells with restricted T-cell receptor beta chain variability after bone marrow transplantation. **Blood**, v. 83, n. 2, p. 587-95, Jan 15 1994. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GROSSE, S. D. et al. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. **Am J Prev Med**, v. 41, n. 6 Suppl 4, p. S398-405, Dec 2011. ISSN 0749-3797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.amepre.2011.09.013> >.

GUAN, Q. et al. Functional Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets Recover Rapidly after Allogeneic Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 7, p. 1205-14, Jul 2015. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.04.015> >.

HAKIM, F. T. et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. **J Clin Invest**, v. 115, n. 4, p. 930-9, Apr 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15776111> >.

HAVERKAMP, J. M. et al. Myeloid-derived suppressor activity is mediated by monocytic lineages maintained by continuous inhibition of extrinsic and intrinsic death pathways. **Immunity**, v. 41, n. 6, p. 947-59, Dec 18 2014. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.020> >.

HAVERKOS, B. M. et al. PD-1 blockade for relapsed lymphoma post-allogeneic hematopoietic cell transplant: high response rate but frequent GVHD. **Blood**, v. 130, n. 2, p. 221-228, Jul 13 2017. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2017-01-761346> >.

HEITGER, A. et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. **Blood**, v. 90, n. 2, p. 850-7, Jul 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9226186> >.

HERBAUX, C. et al. Efficacy and tolerability of nivolumab after allogeneic transplantation for relapsed Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 129, n. 18, p. 2471-2478, May 4 2017. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-11-749556> >.

HERRICK, J. B. **Peculiar elongated and sickle shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia**. Arch. Int. Med. 6: 517-521 p. 1910.

HOBAN, M. D.; ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 839-48, Feb 18 2016. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-09-618587> >.

HONGO, D. et al. Requirement for interactions of natural killer T cells and myeloid-derived suppressor cells for transplantation tolerance. **Am J Transplant**, v. 14, n. 11, p. 2467-77, Nov 2014. ISSN 1600-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.12914> >.

_____. Tolerogenic interactions between CD8(+) dendritic cells and NKT cells prevent rejection of bone marrow and organ grafts. **Blood**, v. 129, n. 12, p. 1718-1728, Mar 23 2017. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-07-723015> >.

HORAN, J. T. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiply transfused patients with sickle cell disease and thalassemia after low-dose total body irradiation, fludarabine, and rabbit anti-thymocyte globulin. **Bone Marrow Transplant**, v. 35, n. 2, p. 171-7, Jan 2005. ISSN 0268-3369 (Print)0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1704745> >.

HORI, J. et al. GITR ligand-mediated local expansion of regulatory T cells and immune privilege of corneal allografts. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 51, n. 12, p. 6556-65, Dec 2010. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.09-4959> >.

HOSSAIN, M. S. et al. PD-1 and CTLA-4 up regulation on donor T cells is insufficient to prevent GvHD in allo-HSCT recipients. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0184254, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0184254> >.

HSIEH, M. M.; FITZHUGH, C. D.; TISDALE, J. F. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: the time is now. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1197-207, Aug 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628400> >.

HSIEH, M. M. et al. Nonmyeloablative HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe sickle cell phenotype. **Jama**, v. 312, n. 1, p. 48-56, Jul 02 2014. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.7192> >.

_____. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 361, n. 24, p. 2309-17, Dec 10 2009. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0904971> >.

IGARASHI, H. et al. GITR ligand-costimulation activates effector and regulatory functions of CD4+ T cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 369, n. 4, p. 1134-8, May 16 2008. ISSN 0006-291x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.024> >.

JACOBSON, C. A. et al. Post-transplantation B cell activating factor and B cell recovery before onset of chronic graft-versus-host disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 20, n. 5, p. 668-75, May 2014. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.01.021> >.

JAGASIA, M. et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 119, n. 1, p. 296-307, Jan 5 2012. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-06-364265> >.

JAGASIA, M. H. et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 3, p. 389-401 e1, Mar 2015. ISSN 1083-8791 (Print)1523-6536 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.001> >.

JENQ, R. R.; BRINK, M. R. M. V. D. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 3, p. 213-221, 2010-02-19 2010. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n3/full/nrc2804.html> >.

JOFFRE, O. et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. **Nat Med**, v. 14, n. 1, p. 88-92, Jan 2008. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm1688> >.

JOHNSON, F. L. et al. Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. **N Engl J Med**, v. 311, n. 12, p. 780-3, Sep 20 1984. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198409203111207> >.

KAABA, S. A.; AL-HARBI, S. A. Reduced levels of CD2+ cells and T-cell subsets in patients with sickle cell anaemia. **Immunol Lett**, v. 37, n. 1, p. 77-81, Jul 1993. ISSN 0165-2478 (Print)0165-2478. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KAMANI, N. R. et al. Unrelated donor cord blood transplantation for children with severe sickle cell disease: results of one cohort from the phase II study from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 18, n. 8, p. 1265-72, Aug 2012. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.01.019> >.

KANTER, J. et al. Interim Results from a Phase 1/2 Clinical Study of Lentiglobin Gene Therapy for Severe Sickle Cell Disease. 2016-12-02 2016. Disponível em: < http://www.bloodjournal.org/content/128/22/1176?sso-checked=true&utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Blood_TrendMD_0 >.

KASSIM, A. A.; SHARMA, D. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anemia: The changing landscape. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, Jun 15 2017. ISSN 1658-3876 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.hemonc.2017.05.008> >.

KATO, G. J. et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. **Br J Haematol**, v. 130, n. 6, p. 943-53, Sep 2005. ISSN 0007-1048 (Print)0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05701.x> >.

KAWAIDA, K. et al. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 10, p. 4357-61, May 10 1994. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KAWASHIMA, N. et al. Increase of bone marrow macrophages and CD8(+) T lymphocytes predict graft failure after allogeneic bone marrow or cord blood transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 52, n. 8, p. 1164-1170, Aug 2017. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2017.58> >.

KEIKHAEI, B. et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **Eur Cytokine Netw**, v. 24, n. 1, p. 45-52, Mar 2013. ISSN 1148-5493. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1684/ecn.2013.0328> >.

KHODER, A. et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. **Blood**, v. 124, n. 13, p. 2034-45, Sep 25 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-04-571125> >.

KHOURY, R.; ABOUD, M. R. Stem-cell transplantation in children and adults with sickle cell disease: an update. **Expert Rev Hematol**, v. 4, n. 3, p. 343-51, Jun 2011. ISSN 1747-4094. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21668398> >.

KIELSEN, K. et al. Reconstitution of Th17, Tc17 and Treg cells after paediatric haematopoietic stem cell transplantation: Impact of interleukin-7. **Immunobiology**, v. 223, n. 2, p. 220-226, Feb 2018. ISSN 0171-2985. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.023> >.

KIM, J. et al. Prevention of chronic graft-versus-host disease by stimulation with glucocorticoid-induced TNF receptor. **Exp Mol Med**, v. 38, n. 1, p. 94-9, Feb 28 2006. ISSN 1226-3613 (Print)1226-3613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2006.11> >.

KIM, J. I. et al. Blockade of GITR-GITRL interaction maintains Treg function to prolong allograft survival. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 5, p. 1369-74, May 2010. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200940046> >.

KINNEY, T. R. et al. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Pediatrics**, v. 103, n. 3, p. 640-5, Mar 1999. ISSN 0031-4005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KLAUS, G. et al. Phenotypic changes in lymphocyte subpopulations in pediatric renal-transplant patients after T-cell depletion. **Transplantation**, v. 76, n. 12, p. 1719-24, Dec 27 2003. ISSN 0041-1337 (Print)0041-1337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000100396.81490.0c> >.

KMIECIK, T. E. et al. Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 80, n. 10, p. 2454-7, Nov 15 1992. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KOHNE, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **Dtsch Arztebl Int**, v. 108, n. 31-32, p. 532-40, Aug 2011. ISSN 1866-0452. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21886666> >.

KOMATSU, M. et al. Antigen-primed CD8+ T cells can mediate resistance, preventing allogeneic marrow engraftment in the simultaneous absence of perforin-, CD95L-, TNFR1-, and TRAIL-dependent killing. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3991-9, May 15 2003. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-09-2859> >.

LAMARTHEE, B. et al. Interleukin-22 in Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Front Immunol**, v. 7, p. 148, 2016. ISSN 1664-3224 (Print)1664-3224. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00148> >.

LAN, F. et al. Host conditioning with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin prevents graft-versus-host disease: the role of CD1-reactive natural killer T cells. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 9, n. 6, p. 355-63, Jun 2003. ISSN 1083-8791 (Print)1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LANZKRON, S.; CARROLL, C. P.; HAYWOOD, C., JR. Mortality rates and age at death from sickle cell disease: U.S., 1979-2005. **Public Health Rep**, v. 128, n. 2, p. 110-6, Mar-Apr 2013. ISSN 0033-3549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/003335491312800206> >.

LEE, S. J. et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4576-83, Dec 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-097386> >.

LERRET, N. M. et al. Donor-specific CD8+ Foxp3+ T cells protect skin allografts and facilitate induction of conventional CD4+ Foxp3+ regulatory T cells. **Am J Transplant**, v. 12, n. 9, p. 2335-47, Sep 2012. ISSN 1600-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04120.x> >.

LI, X. L. et al. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 823-33, Jul 15 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000120> >.

LIAO, W.; LIN, J.-X.; LEONARD, W. J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 13-25, 2013/01/24/ 2013. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761313000113> >.

LIGOCKI, A. J.; NIEDERKORN, J. Y. Advances on Non-CD4 + Foxp3+ T Regulatory Cells: CD8+, Type 1, and Double Negative T Regulatory Cells in Organ Transplantation. **Transplantation**, v. 99, n. 8, p. 1553-9, Aug 2015. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/tp.0000000000000813> >.

LIN, S. J. et al. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. **J Exp Med**, v. 204, n. 10, p. 2321-33, Oct 1 2007. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20062150> >.

LIPSON, E. J. et al. Tumor Regression and Allograft Rejection after Administration of Anti-PD-1. **N Engl J Med**, v. 374, n. 9, p. 896-8, Mar 3 2016. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1509268> >.

LOBO, C. L. et al. The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 161, n. 6, p. 852-60, Jun 2013. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12323> >.

LOCATELLI, F. et al. Outcome of patients with hemoglobinopathies given either cord blood or bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 1072-8, Aug 8 2013. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-03-489112> >.

_____. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2137-43, Mar 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424197> >.

LUCARELLI, G.; GAZIEV, J. Advances in the allogeneic transplantation for thalassemia. **Blood Rev**, v. 22, n. 2, p. 53-63, Mar 2008. ISSN 0268-960X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039551> >.

LUCARELLI, G. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 5, p. a011825, May 2012. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553502> >.

LV, M. et al. Monocytic and promyelocytic myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Am J Hematol**, v. 90, n. 1, p. E9-e16, Jan 2015. ISSN 0361-8609. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23865> >.

MACKALL, C. et al. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. **Bone Marrow Transplant**, v. 44, n. 8, p. 457-62, Oct 2009. ISSN 1476-5365. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861978> >.

MAJUMDAR, S. et al. Outcome of hematopoietic cell transplantation in children with sickle cell disease, a single center's experience. **Bone Marrow Transplant**, v. 45, n. 5, p. 895-900, May 2010. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2009.244> >.

MANAVALAN, J. S. et al. Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. **Int Immunol**, v. 16, n. 8, p. 1055-68, Aug 2004. ISSN 0953-8178 (Print)0953-8178. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxh107> >.

MARIE-CARDINE, A. et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. **Clin Immunol**, v. 127, n. 1, p. 14-25, Apr 2008. ISSN 1521-6616 (Print)1521-6616. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2007.11.013> >.

MARKEY, K. A.; MACDONALD, K. P.; HILL, G. R. The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. **Blood**, v. 124, n. 3, p. 354-62, Jul 17 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-02-514745> >.

MARTIN, P. J. Donor CD8 cells prevent allogeneic marrow graft rejection in mice: potential implications for marrow transplantation in humans. **J Exp Med**, v. 178, n. 2, p. 703-12, Aug 1 1993. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MARTIN, P. J. et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. **Blood**, v. 76, n. 8, p. 1464-72, Oct 15 1990. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MATSUI, N. M. et al. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1955-62, Sep 15 2001. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MATSUOKA, K. et al. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1479-93, May 2010. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci41072> >.

MATTHES-MARTIN, S. et al. Stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning for sickle cell disease. **Eur J Haematol**, v. 90, n. 4, p. 308-12, Apr 2013. ISSN 0902-4441. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/ejh.12082> >.

_____. Risk-adjusted outcome measurement in pediatric allogeneic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 14, n. 3, p. 335-43, Mar 2008. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.12.487> >.

MATTSSON, J.; RINGDEN, O.; STORB, R. Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 14, n. 1 Suppl 1, p. 165-70, Jan 2008. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.10.025> >.

MCCAVIT, T. L. Sickle cell disease. **Pediatr Rev**, v. 33, n. 5, p. 195-204; quiz 205-6, May 2012. ISSN 1526-3347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22550263> >.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? **Curr Opin Hematol**, v. 18, n. 3, p. 158-65, May 2011. ISSN 1065-6251. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834521dd> >.

MCHUGH, R. S. et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **Immunity**, v. 16, n. 2, p. 311-23, Feb 2002. ISSN 1074-7613 (Print)1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MEIER, E. R.; FASANO, R. M.; LEVETT, P. R. A systematic review of the literature for severity predictors in children with sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, Feb 02 2017. ISSN 1079-9796. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.01.014> >.

MENG, F. et al. Clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human renal transplantation with acute T cell-mediated rejection. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1799-805, Oct 2014. ISSN 0360-3997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-014-9910-5> >.

MERRYMAN, R. W. et al. Safety and efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplant after PD-1 blockade in relapsed/refractory lymphoma. **Blood**, v. 129, n. 10, p. 1380-1388, Mar 9 2017. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-09-738385> >.

MOLLET, L. et al. CD8hi+CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity. **Int Immunol**, v. 10, n. 3, p. 311-23, Mar 1998. ISSN 0953-8178 (Print)0953-8178. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MOUGIAKAKOS, D. et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRIow/neg IDO+ myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Leukemia**, v. 27, n. 2, p. 377-88, Feb 2013. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.215> >.

MURIGLAN, S. J. et al. GITR activation induces an opposite effect on alloreactive CD4(+) and CD8(+) T cells in graft-versus-host disease. **J Exp Med**, v. 200, n. 2, p. 149-57, Jul 19 2004. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20040116> >.

MURPHY, W. J.; KUMAR, V.; BENNETT, M. Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells. Differences in kinetics and target antigens recognized. **J Exp Med**, v. 166, n. 5, p. 1499-509, Nov 1 1987. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NAHAVANDI, M. et al. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Br J Haematol**, v. 119, n. 3, p. 855-7, Dec 2002. ISSN 0007-1048 (Print)0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NAKAMURA, T. et al. Rapamycin Prolongs Cardiac Allograft Survival in a Mouse Model by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Am J Transplant**, v. 15, n. 9, p. 2364-77, Sep 2015. ISSN 1600-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.13276> >.

NICKEL, R. S. et al. Immune parameter analysis of children with sickle cell disease on hydroxycarbamide or chronic transfusion therapy. **Br J Haematol**, v. 169, n. 4, p. 574-83, May 2015. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13326> >.

NIFONG, T. P.; DOMEN, R. E. Oxygen saturation and hemoglobin A content in patients with sickle cell disease undergoing erythrocytapheresis. **Ther Apher**, v. 6, n. 5, p. 390-3, Oct 2002. ISSN 1091-6660 (Print)1091-6660. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NOCENTINI, G. et al. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6216-21, Jun 10 1997. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Pharmacological modulation of GITRL/GITR system: therapeutic perspectives. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 7, p. 2089-99, Apr 2012. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01753.x> >.

NOLAN, V. G. et al. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. **Br J Haematol**, v. 133, n. 5, p. 570-8, Jun 2006. ISSN 0007-1048 (Print)0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06074.x> >.

ODIÈVRE, M.-H. et al. Modulation of erythroid adhesion receptor expression by hydroxyurea in children with sickle cell disease. 2008-04-01 2008. Disponível em: < <http://www.haematologica.org/content/93/4/502.short> >.

ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J Med Res**, v. 134, p. 532-7, Oct 2011. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22089617> >.

OGONEK, J. et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Front Immunol**, v. 7, p. 507, 2016. ISSN 1664-3224 (Print)1664-3224. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00507> >.

OHENE-FREMPONG, K. et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 288-94, Jan 1 1998. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OHMACHI, H.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration. **Am J Physiol**, v. 270, n. 6 Pt 1, p. L1031-9, Jun 1996. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OKAMOTO, T. et al. Increased hepatocyte growth factor in serum in acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant**, v. 28, n. 2, p. 197-200, Jul 2001. ISSN 0268-3369 (Print)0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1703095> >.

OLDENBORG, P. A.; GRESHAM, H. D.; LINDBERG, F. P. Cd47-Signal Regulatory Protein α (Sirp α) Regulates Fc γ and Complement Receptor-Mediated Phagocytosis. In: (Ed.). **J Exp Med**, v.193, 2001. p.855-62. ISBN 0022-1007 (Print)1540-9538 (Electronic).

OLDENBORG, P. A. et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. **Science**, v. 288, n. 5473, p. 2051-4, Jun 16 2000. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OLSSON, R. et al. Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant**, v. 48, n. 4, p. 537-43, Apr 2013. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2012.239> >.

OMAZIC, B. et al. Memory B lymphocytes determine repertoire oligoclonality early after haematopoietic stem cell transplantation. **Clin Exp Immunol**, v. 134, n. 1, p. 159-66, Oct 2003. ISSN 0009-9104 (Print)0009-9104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PACIARONI, K.; LUCARELLI, G. Hemopoietic stem cell transplantation failure followed by switch to stable production of fetal hemoglobin. In: (Ed.). **Blood**. United States, v.119, 2012. p.1091-2. ISBN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking).

PACZESNY, S. et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 113, n. 2, p. 273-8, Jan 8 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-07-167098> >.

_____. Graft-versus-host disease biomarkers: omics and personalized medicine. **Int J Hematol**, Aug 2013. ISSN 1865-3774. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959582> >.

PANEPINTO, J. A. et al. Matched-related donor transplantation for sickle cell disease: report from the Center for International Blood and Transplant Research. **Br J Haematol**, v. 137, n. 5, p. 479-85, Jun 2007. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459050> >.

PAPP, G. et al. Regulatory immune cells and functions in autoimmunity and transplantation immunology. **Autoimmun Rev**, v. 16, n. 5, p. 435-444, May 2017. ISSN 1568-9972. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2017.03.011> >.

PARISE, L. V.; BERLINER, N. Sickle cell disease: challenges and progress. In: (Ed.). **Blood**. United States, v.127, 2016. p.789. ISBN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking).

PASSWEG, J. R. et al. The EBMT activity survey: 1990-2010. **Bone Marrow Transplant**, v. 47, n. 7, p. 906-23, Jul 2012. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2012.66> >.

PIEL, F. B. et al. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. **PLoS Med**, v. 10, n. 7, p. e1001484, Jul 2013. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874164> >.

PIKE, R. et al. PD1-Expressing T Cell Subsets Modify the Rejection Risk in Renal Transplant Patients. **Front Immunol**, v. 7, p. 126, 2016. ISSN 1664-3224 (Print)1664-3224. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00126> >.

PINES, M. et al. Halofuginone to treat fibrosis in chronic graft-versus-host disease and scleroderma. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 9, n. 7, p. 417-25, Jul 2003. ISSN 1083-8791 (Print)1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PITANGA, T. N. et al. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. **Cytokine**, v. 83, p. 75-84, Apr 2 2016. ISSN 1043-4666. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.03.016> >.

PLATT, O. S. et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med**, v. 330, n. 23, p. 1639-44, Jun 9 1994. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199406093302303> >.

_____. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **J Clin Invest**, v. 74, n. 2, p. 652-6, Aug 1984. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci111464> >.

PLEASANTS, S. Epidemiology: a moving target. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. S2-3, Nov 13 2014. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/515S2a> >.

QIAN, L.; WU, Z.; SHEN, J. Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease. **J Cell Mol Med**, v. 17, n. 8, p. 966-75, Aug 2013. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23802653> >.

RADHAKRISHNAN, K. et al. Busulfan, fludarabine, and alemtuzumab conditioning and unrelated cord blood transplantation in children with sickle cell disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 19, n. 4, p. 676-7, Apr 2013. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.02.002> >.

RAUTONEN, N. et al. Low number of antibody producing cells in patients with sickle cell anemia. **Immunol Lett**, v. 34, n. 3, p. 207-11, Dec 1992. ISSN 0165-2478 (Print)0165-2478. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 156, n. 4, p. 433-45, Feb 2012. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122125> >.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018-31, Dec 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131035> >.

REICHENBACH, D. K. et al. The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD. **Blood**, v. 125, n. 20, p. 3183-92, May 14 2015. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-10-606830> >.

REMBERGER, M. et al. Major ABO blood group mismatch increases the risk for graft failure after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 13, n. 6, p. 675-82, Jun 2007. ISSN 1083-8791 (Print)1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.01.084> >.

RIBEIL, J. A. et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. **N Engl J Med**, v. 376, n. 9, p. 848-855, Mar 02 2017. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1609677> >.

ROBB, R. J. et al. Identification and expansion of highly suppressive CD8(+)FoxP3(+) regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. **Blood**, v. 119, n. 24, p. 5898-908, Jun 14 2012. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-12-396119> >.

RUBIO, M. T. et al. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. **Blood**, v. 120, n. 10, p. 2144-54, Sep 6 2012. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-01-404673> >.

SADAT-SOWTI, B. et al. A lectin-binding soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from AIDS patients inhibits T cell cytotoxicity. **Eur J Immunol**, v. 21, n. 3, p. 737-41, Mar 1991. ISSN 0014-2980 (Print)0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830210329> >.

SAHA, A. et al. Host programmed death ligand 1 is dominant over programmed death ligand 2 expression in regulating graft-versus-host disease lethality. **Blood**, v. 122, n. 17, p. 3062-73, Oct 24 2013. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-05-500801> >.

SAKAMOTO, T. M. et al. Altered red cell and platelet adhesion in hemolytic diseases: Hereditary spherocytosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and sickle cell disease. **Clin Biochem**, v. 46, n. 18, p. 1798-803, Dec 2013. ISSN 0009-9120. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.09.011> >.

SAKODA, Y. et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1756-64, Feb 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-08-042853> >.

SANDNER, S. E. et al. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. **J Immunol**, v. 174, n. 6, p. 3408-15, Mar 15 2005. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SARANTOPOULOS, S. et al. B cells in chronic graft-versus-host disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 1, p. 16-23, Jan 2015. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.10.029> >.

_____. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 20, p. 6107-14, Oct 15 2007. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-1290> >.

SCHNEIDAWIND, D. et al. Third-party CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality. **Blood**, v. 125, n. 22, p. 3491-500, May 28 2015. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-11-612762> >.

_____. CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. **Blood**, v. 124, n. 22, p. 3320-8, Nov 20 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-05-576017> >.

SCHRIEBER, J. et al. Second unrelated donor hematopoietic cell transplantation for primary graft failure. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 16, n. 8, p. 1099-106, Aug 2010. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.02.013> >.

SERJEANT, G. R. The Natural History of Sickle Cell Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 10, 2013. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23813607> >.

SHENOY, S. et al. A trial of unrelated donor marrow transplantation for children with severe sickle cell disease. **Blood**, v. 128, n. 21, p. 2561-2567, Nov 24 2016. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-05-715870> >.

SHEVACH, E. M.; STEPHENS, G. L. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? In: (Ed.). **Nat Rev Immunol**. England, v.6, 2006. p.613-8. ISBN 1474-1733 (Print)1474-1733 (Linking).

SHIMIZU, J. et al. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat Immunol**, v. 3, n. 2, p. 135-42, Feb 2002. ISSN 1529-2908 (Print)1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni759> >.

SIMÕES, B. P. et al. **Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., p.46-53. 2010

SOBH, M. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for multiple myeloma in Europe: trends and outcomes over 25 years. A study by the EBMT Chronic Malignancies Working Party. **Leukemia**, v. 30, n. 10, p. 2047-2054, Oct 2016. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2016.101> >.

SOCIE, G.; RITZ, J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v. 124, n. 3, p. 374-84, Jul 17 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-01-514752> >.

SOHLBERG, E. et al. Cytomegalovirus-seropositive children show inhibition of in vitro EBV infection that is associated with CD8+CD57+ T cell enrichment and IFN-gamma. **J Immunol**, v. 191, n. 11, p. 5669-76, Dec 01 2013. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1301343> >.

SONI, S. et al. Outcomes of matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation for severe sickle cell disease with myeloablative conditioning and intermediate-dose of rabbit anti-thymocyte globulin. **Pediatr Blood Cancer**, v. 61, n. 9, p. 1685-9, Sep 2014. ISSN 1545-5009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.25059> >.

STEPHENS, G. L. et al. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. **J Immunol**, v. 173, n. 8, p. 5008-20, Oct 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STOREK, J. et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. **Semin Immunopathol**, v. 30, n. 4, p. 425-37, Dec 2008. ISSN 1863-2297 (Print)1863-2297. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-008-0132-5> >.

_____. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3505-12, Dec 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739150> >.

_____. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 98, n. 2, p. 489-91, Jul 15 2001. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STRIOGA, M.; PASUKONIENE, V.; CHARACIEJUS, D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. **Immunology**, v. 134, n. 1, p. 17-32, Sep 2011. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x> >.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343-60, 2004 Oct 9-15 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474138> >.

STYLES, L. A. et al. Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. **Blood**, v. 89, n. 7, p. 2554-9, Apr 1 1997. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUCIU-FOCA, N.; CORTESINI, R. Central role of ILT3 in the T suppressor cell cascade. **Cell Immunol**, v. 248, n. 1, p. 59-67, Jul 2007. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.01.013> >.

SUNG, A. D.; CHAO, N. J. Concise Review: Acute Graft-Versus-Host Disease: Immunobiology, Prevention, and Treatment. 2013-01-01 2013. Disponível em: < <http://stemcellstm.alphamedpress.org/content/2/1/25> >.

THIANT, S. et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioned allo-SCT and relationship to acute GVHD. **Bone Marrow Transplant**, v. 46, n. 10, p. 1374-81, Oct 2011. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2010.300> >.

TRAXLER, E. A. et al. A genome-editing strategy to treat beta-hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. **Nat Med**, v. 22, n. 9, p. 987-90, Sep 2016. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4170> >.

TUMINO, M. et al. Interleukin-22 in the diagnosis of active chronic graft-versus-host disease in paediatric patients. **Br J Haematol**, v. 168, n. 1, p. 142-5, Jan 2015. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13068> >.

TUYAERTS, S. et al. Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 1, p. 93-105, Jul 2007. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0906568> >.

VAN DER MERWE, M. et al. Recipient myeloid-derived immunomodulatory cells induce PD-1 ligand-dependent donor CD4+Foxp3+ regulatory T cell proliferation and donor-recipient immune tolerance after murine nonmyeloablative bone marrow transplantation. **J Immunol**, v. 191, n. 11, p. 5764-76, Dec 1 2013. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1302191> >.

VANDER LUGT, M. T. et al. ST2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death. **N Engl J Med**, v. 369, n. 6, p. 529-39, Aug 8 2013. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1213299> >.

VENDRAMIN, A. et al. Graft monocytic myeloid-derived suppressor cell content predicts the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 20, n. 12, p. 2049-55, Dec 2014. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.09.011> >.

VERMYLEN, C. et al. Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anaemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. **Bone Marrow Transplant**, v. 22, n. 1, p. 1-6, Jul 1998. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9678788> >.

VICARI, P. et al. Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 54, n. 3, p. 244-9, Mar 2015. ISSN 1079-9796. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2014.12.004> >.

VOLTARELLI, J. C. et al. **Imunologia do Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas**. Manual Brasileiro de Transplante de Medula Óssea: 2009.

WALTERS, M. C. et al. Bone marrow transplantation for sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 335, n. 6, p. 369-76, Aug 08 1996. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199608083350601> >.

WANG, H. et al. The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. **Blood**, v. 110, n. 5, p. 1530-9, Sep 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-10-048173> >.

WANG, W. C. et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **Lancet**, v. 377, n. 9778, p. 1663-72, May 14 2011. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60355-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60355-3) >.

WARE, R. E. Hydroxycarbamide: clinical aspects. **C R Biol**, v. 336, n. 3, p. 177-82, Mar 2013a. ISSN 1631-0691. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2012.09.006> >.

_____. Is sickle cell anemia a neglected tropical disease? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e2120, May 2013b. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750287> >.

WAYNE, A. S.; KEVY, S. V.; NATHAN, D. G. Transfusion management of sickle cell disease. **Blood**, v. 81, n. 5, p. 1109-23, Mar 01 1993. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WILLIAMS, K. M.; HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. **Semin Immunol**, v. 19, n. 5, p. 318-30, Oct 2007. ISSN 1044-5323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023361> >.

WU, Z. et al. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. **Nat Med**, v. 10, n. 1, p. 87-92, Jan 2004. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647496> >.

YABE, H. et al. Increased numbers of CD8+CD11+, CD8+CD11- and CD8+Leu7+ cells in patients with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 5, n. 5, p. 295-300, May 1990. ISSN 0268-3369 (Print)0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YIN, J. et al. Circulating CD14(+) HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cells in leukemia patients with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: novel clinical potential strategies for the prevention and cellular therapy of graft-versus-host disease. **Cancer Med**, v. 5, n. 7, p. 1654-69, Jul 2016. ISSN 2045-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.688> >.

YU, Y. et al. Common gamma chain cytokines promote rapid in vitro expansion of allo-specific human CD8+ suppressor T cells. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28948, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028948> >.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. **Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos**. Rev. bras. hematol. hemoter., p.207-214. 2007

ZHANG, D. et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 801-9, Feb 18 2016. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-09-618538> >.

ZHAO, K. et al. Interleukin-22 aggravates murine acute graft-versus-host disease by expanding effector T cell and reducing regulatory T cell. **J Interferon Cytokine Res**, v. 34, n. 9, p. 707-15, Sep 2014. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2013.0099> >.

ZHENG, J. et al. Human CD8+ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 168, p. 168ra9, Jan 16 2013. ISSN 1946-6234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3004943> >.

Apêndices

APÊNDICE A - Delineamento experimental

* Exceto 2 pacientes

Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP: 3551/2002 e 2479/2015

APÊNDICE B - Exemplo dos diferentes STR utilizados na análise de quimerismo celular

Estão representados os 24 STR de um paciente no período pré-transplante. Para a amplificação dos STR foi utilizado o kit comercial *PowerPlex Fusion*.

APÊNDICE C – Populações de células do sistema imunológico avaliadas por citometria

Células CD3+	CD4+CD25hiFoxP3+	CD19+
Células CD3+CD4+	CD4+CD25hiGITR+	CD19+PD-1+
Células CD3+CD8+	CD4+CD25hiFOXP3+CD69+	CD19+IgD+CD38-
CD3+CD4+CD45RA+CD31+	CD4+CD25hiFOXP3+CD39+	CD19+IgD+CD38+
CD4+[CD8+]CD27+CD45RO-	CD4+CD25hiFOXP3+CD73+	CD19+IgD+CD38hi
CD4+[CD8+]CD27+CD45RO+	CD8+CD28-CD57+	CD19+IgD-CD38hi
CD4+[CD8+]CD27-CD45RO+	CD8+CD28-FoxP3+	CD19+IgD-CD38+
CD4+[CD8+]CD27-CD45RO	CD3-CD16+CD56+	CD14-HLA-DR-CD11b+CD33+
CD4+[CD8+]PD-1+	CD3+CD19- Vα24-Jα18 TCR+	CD14+HLA-DR-CD11b+

APÊNDICE D - Estratégia de *gate* para análise de reticulócitos

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de hemácias, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de fluorescência 1 (FL1, Thiazole) nessa *gate* foi representada por um histograma de FL1. Em (A) temos representado a marcação inespecífica do isotipo controle e em (B) um exemplo de marcação dos reticulócitos.

APÊNDICE E - Estratégia de *gate* para análise da expressão de moléculas de adesão em células vermelhas

Durante a aquisição das células a partir solução de hemácias, foi desenhada uma *gate* na população de hemácias, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL1 versus FL2 e de FL1 versus FL3 foi representada por *dot plots* estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isótipo controle (A). Em seguida, temos representado a marcação de CD47 e Thiazole (FL1 versus FL2) (B), de CD36 e Thiazole (FL1 versus FL2) e de CD49d e Thiazole (FL1 versus FL3) (C) a partir da *gate* de hemácias.

APÊNDICE F - Estratégia de *gate* para análise de células T, células T CD4 e T CD8 e expressão de PD-1

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL2 foi representada por um histograma e a marcação de FL1 versus FL3 e de FL1 versus FL4 foi representada por *dot plots*, todos estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos T foi estabelecida por uma *gate* em FL1 (CD3) (B). Também a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de células TCD4 e de células TCD8 foram analisadas por *dot plots* de FL1 versus FL3 e de FL1 versus FL4, respectivamente. As células T duplo positivas (CD3+CD4+ e CD3+CD8+) foram selecionadas e a marcação de FL2 (PD1-PE) avaliada dentro dessas *gates* por histograma de FL2 (C).

APÊNDICE G - Estratégia de *gate* para análise de células B e expressão de PD-1

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL2 foi representada por um histograma de FL2 estabelecido a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos B foi estabelecida por uma *gate* em FL1 (CD19), a partir da qual a marcação de FL2 (PD1-PE) foi avaliada por histograma de FL2 (C).

APÊNDICE H - Estratégia de *gate* de células T recém-emigrantes do timo

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL1 versus FL2 e FL3 versus FL4 foi representada por *dot plots* estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos T CD4 foi avaliada por *dot plot* de FL3 versus FL4. A subpopulação duplo positiva foi estabelecida (CD3+CD4+) e a marcação de FL1 versus FL2 foi avaliada dentro dessa *gate* (B). As células recém-emigrantes do timo foram definidas como CD3+CD4+CD31+CD45RA+.

APÊNDICE I - Estratégia de *gate* para análise de subpopulações de células T CD4 e T CD8

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL1 versus FL2 foi representada por *dot plot* estabelecido a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos T CD4 foi estabelecida por uma *gate* em FL3 (CD4), a partir da qual a marcação de FL1 versus FL2 (CD45RO versus CD27) foi avaliada por *dot plot*. Ainda da mesma *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos T CD8 foi estabelecida por uma *gate* em FL4 (CD8), a partir da qual a marcação de FL1 versus FL2 (CD45ROxCD27) foi avaliada por *dot plot* (B). No número 1 temos a população de linfócitos T de memória efetora (CD4+[CD8+]CD27-CD45RO+), no número 2 os linfócitos T de memória central (CD4+[CD8+]CD27+CD45RO+), no número 3 os linfócitos T *naive* (CD4+[CD8+]CD27+CD45RO-) e no número 4 os linfócitos T efetores diferenciados (CD4+[CD8+]CD27-CD45RO-) (B).

APÊNDICE J - Estratégia de *gate* para análise de subpopulações de células B

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL2 versus FL4 foi representada por um *dot plot* estabelecido a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos B foi estabelecida por uma *gate* em FL1 (CD19), a partir da qual a marcação de FL2 versus FL4 (IgD versus CD38) foi avaliada por *dot plot* (B). No número 1 temos os linfócitos *naive* (CD19⁺IgD⁺CD38⁻), no número 2 s linfócitos B *naive* ativados (CD19⁺IgD⁺CD38⁺), no número 3 os linfócitos B pré-centro germinativo (CD19⁺IgD⁺CD38^{hi}), no número 4 os linfócitos B centroblastos/centrócitos (CD19⁺IgD⁻CD38^{hi}), no número 5 os linfócitos B de memória recente (CD19⁺IgD⁻CD38⁺) e no número 6 os linfócitos B de memória tardia (CD19⁺IgD⁻CD38⁻).

APÊNDICE K - Estratégia de *gate* para análise de células T CD4 reguladoras expressando GITR

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL1 versus FL4 foi representada por um *dot plot* e de FL2 por um histograma estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos T CD4CD25 foram avaliados por *dot plot* de FL1 versus FL4. A subpopulação CD4+CD25hi foi estabelecida, a partir da qual a marcação de FL2 (GITR-PE) foi avaliada por histograma de FL2 (B).

APÊNDICE L - Estratégia de *gate* para análise de células T CD4 e CD8 reguladoras expressando FOXP3

A

B

C

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL2 foi representada por um histograma de FL2 e a marcação de FL1 versus FL3 e FL1 versus FL4 foi representada por *dot plots*, todos estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos CD4CD25^{hi} foi analisada por *dot plot* de FL1 versus FL4. As células CD4+CD25^{hi} foram selecionadas e a marcação de FL2 (FOXP3-PE) avaliada dentro dessa *gate* por histograma de FL2 (B). Também a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos CD8CD28 foi analisada por *dot plot* de FL1 versus FL3. As células CD8+CD28- foram selecionadas e a marcação de FL2 (FOXP3-PE) avaliada dentro dessa *gate* por histograma de FL2 (C).

APÊNDICE M - Estratégia de *gate* para análise de células T CD4 reguladoras expressando CD39

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL1 versus FL3 e a marcação de FL2 versus FL4 foi representada por *dot plots* estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos CD4CD25^{hi} foi analisada por *dot plot* de FL1 versus FL3. As células CD4+CD25^{hi} foram selecionadas e a marcação de FL2 versus FL4 (FOXP3 versus CD39) avaliada dentro dessa *gate* por *dot plot* (B). A população de células T reguladoras foi definida como CD4+CD25^{hi}FOXP3+CD39+.

Apêndice N - Estratégia de *gate* para análise de células T CD4 reguladoras expressando CD69 ou CD73

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL1 versus FL4 e a marcação de FL2 versus FL3 foi representada por *dot plots* estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isótipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos CD4CD25^{hi} foi analisada por *dot plot* de FL1 versus FL4. As células CD4⁺CD25^{hi} foram selecionadas e a marcação de FL2 versus FL3 (FOXP3 versus CD69 ou FOXP3 versus CD73) avaliada dentro dessa *gate* por *dot plot* (B). A população de células T reguladoras foi definida como CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺CD69⁺ ou como CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺CD73⁺.

APÊNDICE O - Estratégia de *gate* para análise de células T CD8 reguladoras expressando CD57

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL2 versus FL3 foi representada por um *dot plot* e de FL1 por um histograma estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos T CD8CD28 foram avaliados por *dot plot* de FL2 versus FL3. A subpopulação CD8⁺CD28⁺ foi estabelecida, a partir da qual a marcação de FL1 (CD57-FITC) foi avaliada por histograma de FL2 dentro dessa *gate* (B).

APÊNDICE P - Estratégia de *gate* para análise de células supressoras derivadas da linhagem mieloide

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população mieloide, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL1 versus FL2 e de FL3 versus FL4 foi representada por *dot plot* estabelecidos a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Da população total, a marcação de FL2 versus FL3 foi representada por *dot plot* estabelecido a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (B). Em seguida, a partir da *gate* de células mieloides, a marcação de FL3 versus FL4 (HLA-DR versus CD14) foi avaliada por *dot plot*. A população de células CD14-HLA-DR- foi estabelecida e a partir dela foi avaliada a marcação de FL1 versus FL2 (CD33 versus CD11b) (C). Da população total, a subpopulação monocítica foi estabelecida por uma *gate* em FL4 (CD14), a partir da qual a marcação de FL2 versus FL3 foi avaliada por *dot plot* (HLA-DR versus CD11b) (C). As MDSC-G foram definidas como CD14-HLA-DR-CD11b⁺CD33 e as MDSC-M como CD14⁺HLA-DR-CD11b⁺.

APÊNDICE Q - Estratégia de *gate* para análise de células NK

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL1 versus FL2 foi representada por um *dot plot* estabelecido a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de células NK foi avaliada por *dot plot* de FL1 versus FL3 (CD3 versus CD16,56) (B). As células NK foram definidas como CD3-CD16+CD56+.

APÊNDICE R - Estratégia de *gate* para análise de células iNKT

Durante a aquisição das células a partir do sangue periférico, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). A marcação de FL2 versus FL3 foi representada por um *dot plot* e de FL1 por um histograma estabelecido a partir da marcação inespecífica do isotipo controle (A). Em seguida, a partir da *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos T CD19CD3 foram avaliados por *dot plot* de FL2 versus FL3. A subpopulação CD19-CD3⁺ foi estabelecida, a partir da qual a marcação de FL1 (TCR Vα24/Jα18 -FITC) foi avaliada por histograma de FL1 dentro dessa *gate* (B).

APÊNDICE S - Concentração (pg/mL) de citocinas no plasma de indivíduos sadios e de pacientes com DF tratados com o TCTH

		Controle	Pre-Tx	1mo	3mo	6mo	12mo	24mo	36mo	48mo	60mo
IL-1b	Média	0	0	0	0	0	0,18	0,1815	0	0	0
	DP	0	0	0	0	0	0,7637	0,453	0	,	0
IL-2	Média	0	0	0	0	0	1,272	0,6538	0	0	0
	DP	0	0	0	0	0	3,711	2,357	0	,	0
IL-4	Média	0	0,033	0,178	0,142	0	0,787	0,518	0	0	0,28
	DP	0	0,142	0,71	0,601	0	2,543	1,082	0	,	0,485
IL-5	Média	0	0	0	0	1,109	15,044	1,962	0	0	0
	DP	0	0	0	0	4,296	45,902	7,072	0	,	0
IL-6	Média	0	0	0,2994	0	0	0,6578	0,2577	0	0	0
	DP	0	0	1,198	0	0	2,108	0,9291	0	,	0
IL-7	Média	0	4,763	12,718	7,598	19,223	46,328	6,342	5,562	0	4,543
	DP	0	12,25	29,969	16,763	59,724	193,612	10,715	9,997	,	7,869
IL-8	Média	0	7,396	27,551	7,996	4,349	11,059	6,722	3,753	0	7,777
	DP	0	8,69	60,455	10,472	5,374	27,779	6,755	4,367	,	2,25
IL-10	Média	0	0,5284	1,21	0,4739	18,07	2,569	1,552	0	0	0
	DP	0	2,303	3,445	2,011	70	9,295	3,903	0	,	0
IL-12	Média	0	0	0	0,384	11,721	14,871	0,921	0	0	0
	DP	0	0	0	1,631	41,914	53,441	3,32	0	,	0
IL-13	Média	0	0	0,18	0,16	25,455	0,726	1,26	0	0	0
	DP	0	0	0,72	0,679	98,586	1,804	2,767	0	,	0
IL-17	Média	0	0	0,7913	0,7033	0	2,903	1,074	0	0	0
	DP	0	0	3,165	2,984	0	8,912	3,872	0	,	0
IL-33	Média	10,124	13,627	12,677	12,291	14,337	10,691	10,312	11,11	0	11,73
	DP	7,211	7,276	6,18	7,251	6,036	6,143	9,375	6,411	,	12,079
Endotelina-1	Média	0	0,5732	0,5494	0	0	0	0	0	0	0
	DP	0	2,498	2,198	0	0	0	0	0	0	0
G-CSF	Média	0	19,701	103,116	2,041	43,399	0	3883,638	0	0	0
	DP	0	42,898	412,465	8,657	168,085	0	14002,658	0	,	0
GM-CSF	Média	0	0	0	0	0	1,794	0,588	0	0	0
	DP	0	0	0	0	0	4,544	1,593	0	,	0
IFN γ	Média	0	0	0,511	0,263	0,344	4,854	1,166	0	0	1,58
	DP	0	0	2,045	1,117	1,332	14,221	3,074	0	,	2,737

Anexos

ANEXO A – Aprovação do estudo no comitê de ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 10 de junho de 2015

Ofício nº 2090/2015
CEP/MGV

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **“TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA EM ANEMIA FALCIFORME: IMPACTO DO PROCEDIMENTO SOBRE MARCADORES DA DOENÇA E QUALIDADE DE VIDA” – Versão 1.1, de 25/05/2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 409ª Reunião Ordinária realizada em 08/06/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 1.1, de 25/05/2015 e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, de 25/05/2015**, de acordo com o Processo HCRP nº 2479/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora

PROF^a. DR^a. BELINDA PINTO SIMÕES

Depto. de Clínica Médica

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os pacientes com DF

“Transplante de Medula Óssea em anemia falciforme: impacto do procedimento sobre marcadores da doença e qualidade de vida”.

Pesquisadores responsáveis:

Júlia Teixeira Cottas de Azevedo/ Ana Carolina Freitas Silveira Sobral Paixão / Dra. Kelen Cristina Ribeirão Malmegrim de Farias/ Dra. Belinda Pinto Simões

Prezado voluntário,

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor os mecanismos imunológicos, hematológicos e inflamatórios envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com anemia falciforme tratados o transplante de células-tronco hematopoéticas. A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

A anemia falciforme (AF) é uma doença inflamatória crônica relativamente frequente na população brasileira. Atualmente, ela é tratada pelo uso de hidroxiureia e por transfusões sanguíneas, contudo essas formas de tratamento possuem limitações e nem todos pacientes com AF respondem a elas. A única opção curativa para esses pacientes é o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (TCTH), entretanto o estudo de pacientes com AF transplantados é muito pequeno e os mecanismos de reconstituição imuno-hematológica após o transplante não são completamente entendidos. Portanto, o objetivo dessa pesquisa é analisar a resposta terapêutica de pacientes com anemia falciforme tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, por meio da avaliação de marcadores inflamatórios, imunológicos e hematológicos, além de avaliar os mecanismos de reconstituição imuno-hematológica após o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.

Como será feita esta pesquisa?

Como você tem indicação para transplante de medula óssea pela sua doença você será avaliado clinicamente com exames de sangue e radiografias para avaliarmos a sua situação clínica. Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento você receberá os questionários de qualidade de vida a serem preenchidos. Estes questionários você deverá preencher novamente após o transplante de medula óssea (dia 60,1 ano e depois de suspender a ciclosporina que pode demorar de 18 a 24 meses).

A coleta de sangue periférico será feita por punção de veia do braço, após assepsia do local, pela equipe de enfermagem do Hemocentro de Ribeirão Preto. A partir do sangue coletado, serão feitas análises a fresco (sangue total), serão isolados o soro e plasma e serão extraídos o DNA e RNA para as análises posteriores.

O que será feito com as células remanescentes a este estudo?

As células remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no biorepositório de AMOSTRAS DE SANGUE E MEDULA ÓSSEA DA FMRP-USP2 para análises futuras, com finalidade científica, como você já concordou.

Como você vai participar da pesquisa, quais são os riscos que podem ocorrer?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 89 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Além do desconforto da picada da agulha no momento da coleta de sangue, outros riscos que podem ocorrer são: formação de hematomas no local da punção venosa, dor e mais raramente, infecção no local da punção.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu atendimento e tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Tendo em vista que as coletas todas serão realizadas nos retornos de rotina não haverá viagens ou despesas adicionais exclusivamente para o projeto. Assim não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a tentar melhorar no futuro o tratamento de pessoas com anemia falciforme. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento.

Caso você se sinta prejudicado por esta pesquisa terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

Você receberá uma via deste documento e terá caso deseje ao final da pesquisa acesso aos resultados obtidos com a pesquisa. Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato pelo telefone 3602-2609. Você poderá também contatar o comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no telefone 016 36022228 para dúvidas éticas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento

Nome participante _____

Assinatura _____

Data: ____/____/____

Nome pesquisador _____

Assinatura _____

Data: ____/____/____

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos sadios**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Nome do projeto de pesquisa:**

“Transplante de Medula Óssea em anemia falciforme: impacto do procedimento sobre marcadores da doença e qualidade de vida”.

Pesquisadores responsáveis:

Júlia Teixeira Cottas de Azevedo/ Ana Carolina Freitas Silveira Sobral Paixão / Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias/ Dra. Belinda Pinto Simões

Prezado voluntário,

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor os mecanismos imunológicos, hematológicos e inflamatórios envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com anemia falciforme tratados o transplante de células-tronco hematopoéticas. A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

A anemia falciforme (AF) é uma doença inflamatória crônica relativamente frequente na população brasileira. Atualmente, ela é tratada pelo uso de hidroxiureia e por transfusões sanguíneas, contudo essas formas de tratamento possuem limitações e nem todos pacientes com AF respondem a elas. A única opção curativa para esses pacientes é o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (TCTH), entretanto o estudo de pacientes com AF transplantados é muito pequeno e os mecanismos de reconstituição imuno-hematológica após o transplante não são completamente entendidos. Portanto, o objetivo dessa pesquisa é analisar a resposta terapêutica de pacientes com anemia falciforme tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, por meio da avaliação de marcadores inflamatórios, imunológicos e hematológicos, além de avaliar os mecanismos de reconstituição imuno-hematológica após o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. **Caso aceite a participar, suas células do sangue serão utilizadas como controles sadios em experimentos da nossa pesquisa.**

Como será feita esta pesquisa?

Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento, a coleta de sangue periférico será feita por punção de veia do braço, após assepsia do local, pela equipe de enfermagem do Hemocentro de Ribeirão Preto. A partir do sangue coletado, serão feitas análises a fresco (sangue total), serão isolados o soro e plasma e serão extraídos o DNA e RNA para as análises posteriores.

O que será feito com as células remanescentes a este estudo?

As células remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no biorepositório de AMOSTRAS DE SANGUE E MEDULA ÓSSEA DA FMRP-USP2 para análises futuras, com finalidade científica, como você já concordou.

Como você vai participar da pesquisa, quais são os riscos que podem ocorrer?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 89 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Além do desconforto da picada da agulha no momento da coleta de sangue, outros riscos que podem ocorrer são: formação de hematomas no local da punção venosa, dor e mais raramente, infecção no local da punção.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para seu processo de doação voluntário de sangue.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a tentar melhorar no futuro o tratamento de pessoas com anemia falciforme. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Caso você se sinta prejudicado por esta pesquisa terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo.

Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato com Júlia Teixeira Cottas de Azevedo pelo telefone 2101-9300 (ramal 9605). Você poderá também contatar o comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no telefone 016 36022228 para dúvidas éticas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento

Nome do participante: _____ Assinatura _____

Data: ____/____/____

Nome do pesquisador: _____ Assinatura _____

Data: ____/____/____