Luis Klaus Alves da Rocha

**Avaliação da reconstituição da função tímica e a
caracterização das subpopulações de linfócitos T e do perfil de
citocinas em pacientes submetidos ao transplante alogênico de
células-tronco hematopoiéticas que desenvolveram doença do
enxerto-contra-hospedeiro**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luiza Guilherme Guglielmi

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011
(a versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Luis Klaus Alves da

Avaliação da reconstituição da função tímica e a caracterização das subpopulações de linfócitos T e do perfil de citocinas em pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas que desenvolveram doença do enxerto-contrá-hospedeiro / Luis Klaus Alves da Rocha. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Luiza Guilherme Guglielmi.

Descritores: 1.Antígenos HLA 2.Citocinas 3.Doença enxerto-hospedeiro
4.Doenças hematológicas 5.Linfócitos T 6.Sistema imunológico 7.Timo
8.Transplante autólogo 9.Transplante homólogo 10.Transplante de células tronco-hematopoiéticas

USP/FM/DBD-143/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedico todo o meu esforço para a realização desta tese à minha querida esposa Luciana Maragno, pois esteve comigo desde seu início e suportou minhas ansiedades, medos e dúvidas ao longo do tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge E. Kalil Filho, responsável pelo programa de Pós-graduação de Alergia e Imunopatologia, Fac. de Medicina da USP, pela oportunidade de apresentar esta Tese no Programa de Doutorado. De forma muito especial às minhas orientadoras, Dra. Luiza Guilherme e Dra. Clarisse M. Machado, que me permitiram dar mais esse passo no meu saber e crescimento intelectual. Este trabalho contou com a colaboração de várias pessoas.

Agradeço aos pacientes que participaram do estudo. De forma especial, aos funcionários do Hospital Amaral Carvalho, em Jaú, entre eles os Dr. Vergílio Antonio R. Colturato, Dr. Mair Pedro de Souza e Dra. Maura Rosane V. Ikoma que abriram as portas do hospital para meu livre acesso. Às secretárias do hospital dia que ajudaram a captar os pacientes, ao corpo de enfermagem que coletaram as amostras, representada pela enf. Ana Claudia F. dos Santos e de forma muito especial, à enf. Lúcia Helena de A. Testa que, através de sua simplicidade e simpatia, ajudou-me no encontro dos pacientes para aplicar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

À equipe do setor de citoquímica (Dra. Marina de O. e Souza, Leila Cibele S. de Oliveira e Lilian P. Zanetti), no auxílio à conservação das amostras, à equipe de Citometria de Fluxo (Marcimara Penitenti, Camila M. Bertolucci e Joana E. Conti) que trabalhou nas análises das populações linfocitárias. Às bolsistas, Alexia Bollini e Francine Bandeira que atuaram na separação do plasma e extração do DNA e ao Anderson José Simioni (*data manager*) que ajudou na escolha dos parâmetros para a análise dos dados.

Na Biol. Molecular, agradeço à Caroline S. Faria, pois me ajudou durante as análises finais das amostras de DNA (foram mais de 1500 análises e muitos fins de semanas e feriados se passaram...), no InCor à Dra. Samar Freschi de Barros, no auxílio na bancada com pipetas, tubos eppendorf, etc. e também na feitura do gel de eletroforese e quantificação do DNA. Agradeço à Dra. Ludmila R. P. Ferreira que me ajudou nas análises iniciais por qPCR, aos queridos Profs. Dr. Edécio C. Neto que me confiou o aparelho de qPCR e contribuiu com valiosas críticas e Dra. Verônica P. C. de V. Coelho que no início de minha pesquisa contribuiu com discussão de artigos e várias críticas construtivas. Sem contar outras pessoas que no início do projeto ajudaram-me a escrevê-lo com suas valiosas opiniões, a saber, o físico Dr. Frederico M. Ferreira, a

biomédica Maria Lucia A. C. Marin, as ex-pós-graduandas Dra. Dayane A. Costa e Dra. Priscilla R. Costa, ainda o administrador Jair M. Martins e a secretária Fernanda Alegria no auxílio aos relatórios da FAPESP. Nos EUA, à Dra. Latta Reddy que me ensinou a fazer os cálculos do TREC (círculo excisional do receptor de células T). Não posso me esquecer da patologista Dra. Jussara B. Castelli, que insistiu muito para que eu voltasse para a área de pesquisa e, assim, fizesse o doutorado, sendo que na época eu estava bem descrente em seguir por esse caminho e foi ela quem me apresentou às minhas orientadoras.

Tenho que recordar os eternos membros da minha memória passada e/ou presente porque foi por meio dessas pessoas que cheguei a essa etapa da carreira: a patologista Dra. Marília Cechella, os hematologistas Dr. Dalnei V. Pereira e Dr. Waldir V. Pereira e o nefrologista Dr. José Osmar Medina Pestana; a minha mãe Concórdia Alves da Rocha e minha irmã Claudia Alves da Rocha por gostarem e acreditarem em mim, apesar de todos os meus defeitos, anseios, dúvidas e dificuldades.

Agradeço também aos membros da minha Banca de Qualificação Prof. Dr. Edécio C. Neto já citado anteriormente, Dra. Maria Cristina M. de Almeida Macedo, Prof. Dr. Fábio R. Kerbaui e Prof. Dr. Milton Artur Ruiz que muito contribuíram com suas opiniões para melhorar a exposição de meus resultados.

Durante essa jornada, duas instituições foram apoios importantes: COLSAN (Associação Beneficente de Coleta de Sangue), sob a licença do Dr. Afonso José P. Cortez, propiciou-me o acesso às agências de coletas para buscar doadores de sangue e aplicar o TCLE; o CHSP (Centro de Hematologia de São Paulo), sob a licença de Dra. Nydia S. Bacal, disponibilizou as análises de leucogramas dos indivíduos saudáveis.

Agradeço o apoio da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por ter acreditado e financiado o projeto.

Sem esse batalhão de boas almas ao meu redor, eu não teria feito absolutamente nada. Alguns deles, inclusive, de um relacionamento profissional baseado na cordialidade passaram para um relacionamento de amizade baseado no carinho, respeito e admiração. Que sorte a minha, sem palavras!

A melhor expressão de agradecimento é um glamoroso “Muito Obrigado”!

“Tente mover o mundo, o primeiro passo será mover a si mesmo.”

Platão

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver-NIH, adotado por U.S. National Library of Medicine).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de Quadros

Lista de tabelas

Lista de siglas

Lista de símbolos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	17
2.1	Geral ou primário	18
2.2	Específicos secundários.....	18
3	MÉTODOS	19
3.1	Modelo do estudo	20
3.2	Inclusão de pacientes.....	21
3.2.1	Amostras de sangue	22
3.3	Indivíduos saudáveis	24
3.4	Avaliação laboratorial	25
3.4.1	Citometria de fluxo e subpopulações de linfócitos.....	25
3.4.2	Luminex® e citocinas.....	44
3.4.3	qPCR e o sjTREC	45
3.4.3.1	Quantificação do DNA.....	46
3.4.3.2	Eletroforese de DNA em gel de agarose	46
3.4.3.3	Amplificação e quantificação do gene por qPCR	47
3.5	Avaliação clínica de DECH	50
3.6	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Situação pré-transplante	55
4.2.1	Fatores de risco para DECH-C	71
4.2.2	Sobrevida global e sobrevida livre de eventos	76
4.2.3	Regime de condicionamento, tipo de TCTH e recuperação da função tímica	86
4.2.4	Infecções, enxertia medular e função tímica	89
4.2.5	Recuperação da função tímica, tipo de TCTH-alo e ATG	95
4.2.6	Função tímica e óbito	96
4.2.7	Quantificação de sjTREC, valor preemptivo?.....	97
4.2.8	Recuperação dos linfócitos T e B e das células NK.....	99
5	DISCUSSÃO	123
6	CONCLUSÕES	143
7	ANEXOS	147
8	REFERÊNCIAS.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS

alo	alogênico
auto	autólogo
g	giros (velocidade de centrifugação)
linf	linfócitos
linf T mem	linfócitos T de memória
linf T mem cen	linfócitos T de memória central
linf T mem efet	linfócitos T de memória efetora
linf T <i>naive</i>	linfócitos T virgem
linf T reg	linfócitos T reguladores
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetros
mM	milimol
ng	nanograma
nm	nanometro
pb	pares de base
pg	picograma
µg	micrograma
µL	microlitro
V	voltagem

LISTA DE SIGLAS

ABO	sistema sanguíneo ABO
ATG	globulina antitimócito
AUC	<i>area under curve</i>
BAFF	<i>B-cell activating fator</i>
BCR	receptor de células B
CD	<i>cluster differentiation</i> (ou epítipo de diferenciação celular)
CSA	ciclosporina
CMV	citomegalovírus
CPH	complexo principal de histocompatibilidade
cjTREC	coding joint-círculo excisional do receptor de células T
CTH	células-tronco hematopoiéticas
CTP	células-tronco periféricas
CXCL	quimiocina (<i>C-X-C motif</i>)
CXCR	receptor de quimiocina (<i>C-X-C motif</i>)
DECH	doença do enxerto-contra-hospedeiro
DECH-A	doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda
DECH-C	doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica
DH	doença de Hodgkin
DLI	<i>donor lymphocyte infusion</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
EBV	<i>Epstein Barr Virus</i>
ECOG	eastern cooperative oncology group
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ETR	emigrantes tímicos recentes
FoxP3	fator de transcrição <i>forkhead box P3</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HIV	vírus da imunodeficiência humana (adquirida)
HLA	sistema antígeno leucocitário humano
HR	<i>harzard ratio</i> (ou risco relativo)
IL	interleucinas
INF	interferon
LLA	leucemia linfocítica aguda
LMA	leucemia mielocítica aguda
LNH	linfoma não hodgkin

MAC	regime de condicionamento mieloablativo
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MM	mieloma múltiplo
MO	medula óssea
MTX	metotrexato
NIH	National Institute of Health
NK	<i>natural killer</i>
NMA	regime de condicionamento não mieloablativo
OR	<i>odds ratio</i> (ou razão de chances)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (ou células mononucleares)
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RIC	regime de condicionamento de intensidade reduzida
RNA	ácido ribonucleico
ROC	curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
RR	risco relativo
SG	sobrevida global
sjTREC	signal joint círculo excisional do receptor de células T
SLE	sobrevida livre de eventos
SMD	síndrome mielodisplásica
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBI	<i>total body irradiation</i> (ou irradiação corporal total)
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	receptores de células T
TCTH	transplante de células-tronco hematopoiéticas
TCTH-alo	transplante de células-tronco hematopoiéticas-allogênico
TCTH-auto	transplante de células-tronco hematopoiéticas-autólogo
TGF	transforming growth factor
Th (1 ,2 ou 17)	resposta imune T <i>helper</i>
TNF	fator de necrose tumoral
VZV	<i>varicela zoster virus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
$<$	Menor que
$\leq$	Menor ou igual a
$>$	Maior que
$\geq$	Maior ou igual a
$=$	Igual a

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O sistema HLA no cromossomo 6	3
Figura 2. Célula-tronco hematopoiética e a hematopoese	4
Figura 3. Rearranjo do segmento gênico V(D)J e eliminação de TREC durante processo de maturação do TCR	7
Figura 4. Proliferação do timócito, formação de TRECs (β e sj) e migração para o sangue periférico como ETR	7
Figura 5. Processo de maturação do linfócito T (ou timócito) no timo.....	8
Figura 6. Exposição do ETR ao antígeno e formação dos linfócitos T efetores e de memória CD4^+ e CD8^+	9
Figura 7. Tipos de respostas imunes de acordo com o agente (antígeno) em exposição	10
Figura 8. Mecanismos de tolerância dos linfócitos T	11
Figura 9. a) DECH, exemplo de infiltrado linfocitário em DECH-A na epiderme e derme (H&E) b) reação por imunohistoquímica com anticorpo anti- CD8^+ , agressão aos queratinócitos por linfócitos T	13
Figura 10. Prevalência de agentes infecciosos de acordo com as fases do TCTH.....	15
Figura 11. Desenho do estudo	20
Figura 12. Fluxograma das amostras – desde as coletas até sua análise em citometria de fluxo, Luminex® e qPCR – etapas 1, 2 e 3	23
Figura 13. Fluxo de coleta amostral de acordo com o período do TCTH	23
Figura 14. Distribuição dos pacientes de acordo com o estado de origem.....	24
Figura 15. Distribuição de acordo com a faixa etária dos indivíduos saudáveis (18-60 anos) captados para coletas amostrais	25
Figura 16. Fluxograma de pesquisa das populações de linfócitos T e subpopulações, linfócitos B e células NK	27
Figura 17a. Identificação da população de interesse de acordo com a dispersão frontal (FSC – <i>forward scatter</i>) e lateral (SSC – <i>side scatter</i>)	28
Figuras 17b-c. Identificação dos linfócitos T CD3^+ , B CD19^+ e célula NK CD56^+	29
Figuras 17d-e2. Identificação dos linfócitos T $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ ou CD8^+ e dos ETR $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ ou CD8^+	31
Figuras 17f-g4. Identificação dos linfócitos T $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$: mem efet $\text{CCR7}^{\text{neg}} \text{CD45RA}^{\text{neg}}$, efet $\text{CCR7}^{\text{neg}} \text{CD45RA}^+$; <i>naive</i> $\text{CCR7}^+ \text{CD45RA}^+$; mem cen $\text{CCR7}^+ \text{CD45RA}^{\text{neg}}$; e suas células em estado de ativação HLA-DR^+ e CD38^+	33

Figuras 17h-i4. 7h-i4. Identificação dos linfócitos T $CD3^+CD8^+$: mem efet $CCR7^{neg}CD45RA^{neg}$, efet $CCR7^{neg}CD45RA^+$; <i>naive</i> $CCR7^+CD45RA^+$; mem cen $CCR7^+CD45RA^{neg}$ e suas células em estado de ativação HLA-DR ⁺ e CD38 ⁺	36
Figuras 17j-k4. Identificação dos linfócitos T $CD3^+CD4^+$: mem efet $CCR7^{neg}CD45RA^{neg}$; mem cen $CCR7^+CD45RA^{neg}$; <i>naive</i> $CCR7^+CD45RA^+$; efet $CCR7^{neg}CD45RA^+$; e as respectivas respostas Th-1 $CXCR3^+CCR6^{neg}$, Th-2 $CXCR3^{neg}CCR6^{neg}$ e Th-17 $CXCR3^{neg}CCR6^+$	38
Figuras 17l-n. Identificação dos linfócitos T $CD3^+CD4^+$: Regulador $CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ e os subtipos <i>naive</i> $CD45RO^{neg}$ e mem $CD45RO^+$ em seus estados de ativação HLA-DR ⁺	40
Figuras 17o1-7. Identificação do controle isotipo para o FoxP3.....	43
Figura 18. Exemplo de curva do ensaio Luminex [®] – Curvas das citocinas TGF- β 1 e IFN- γ	45
Figura 19. Imagem de um gel de agarose com corrida de eletroforese	46
Figura 20a. Amplificação da curva-padrão para TREC	48
Figura 20b. Curva-padrão para TREC	48
Figura 20c. Amplificação da curva-padrão para β -Actina	48
Figura 20d. Curva-padrão para β -Actina	49
Figura 20e. Exemplo de amplificação dos DNAs sjTREC (alvo) e β -Actina (calibrador)	49
Figura 21. Cálculo utilizado para expressão do sjTREC na unidade μ g de DNA	50
Figura 22. Fluxograma de inclusão de pacientes para o estudo	54
Figura 23. Comparação na quantificação de linfócitos entre pacientes e indivíduos saudáveis.....	56
Figura 24. Comparação na quantificação de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis.....	56
Figura 25. Variação na quantificação de linfócitos, comparação entre pacientes e indivíduos saudáveis.....	57
Figura 26. Variação na quantificação de sjTREC, comparação entre pacientes e indivíduos saudáveis	57
Figura 27. Variação da idade entre os pacientes e os indivíduos saudáveis.....	58
Figura 28. Diagrama de dispersão - relação negativa entre idade (eixo x) e sjTREC cópias (eixo y) nos dois grupos de indivíduos (pacientes e indivíduos saudáveis).....	59
Figura 29. Distribuição da população estudada de acordo com faixas etárias	60
Figura 30. Quantificação de sjTREC de acordo o sexo da população	62

Figura 31. Diagrama de dispersão - relação entre idade (eixo x) e sjTREC cópias (eixo y) nos dois grupos de indivíduos (indivíduos saudáveis e pacientes) e também por sexo.....	64
Figura 32. Quantificação de sjTREC de acordo o tipo de doença prévia ao TCTH	66
Figura 33. Quantificação de sjTREC pacientes de todas as idades e indivíduos saudáveis mais velhos (≥ 50 anos)	69
Figuras 34 a-d. Incidência cumulativa de eventos de infecção e de DECH, de acordo com sjTREC	75
Figuras 35a-h: Sobrevida Global para idade, sexo, fonte de células, condicionamento, TCTH, enxertia, função tímica e DECH.....	85
Figura 36. Recuperação da função tímica - comparação entre a situação antes do TCTH e o fim do primeiro ano	88
Figura 37. Incidência de infecção ao longo do primeiro ano de TCTH, separada em três grupos – TCTH-alo com DECH-C, TCTH-alo sem DECH e TCTH-auto.....	89
Figura 38. Distribuição dos episódios de infecção entre: bactérias, vírus e fungos	90
Figura 39. Distribuição dos pacientes de acordo com a enxertia medular e função tímica aos 12 meses do TCTH.....	92
Figura 40. Curva ROC da quantificação de sjTREC aos 3 meses do TCTH e eventos futuros de DECH-C.	98
Figura 41. Evolução das células mononucleares (linfócitos T CD3 ⁺ , B CD19 ⁺ e NK CD56 ⁺).....	99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação utilizada para avaliação clínica dos pacientes para ingresso no estudo	22
Quadro 2. Distribuição dos anticorpos de acordo com os fluorocromos e os tubos de ensaio	26
Anexo A: Quadro 3. Classificação e estadiamento da DECH-A.....	148
Anexo B1: Quadro 4. Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos para DECH-C	149
Anexo B2: Quadro 5. Escore clínico para classificação da DECH-C	151
Anexo B3: Quadro 6. Graduação da intensidade de DECH-C	153
Anexo C1: Quadro 7. (parte 1) Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos na DECH-C (formulário A – avaliação do médico).....	154
Anexo C1: Quadro 7. (parte 2) Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos na DECH-C (formulário A – avaliação do médico).....	155
Anexo C2: Quadro 8. Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos para DECH-C (formulário B – avaliação do paciente)	156
Anexo D: Quadro 9. Avaliação de desempenho dos pacientes em suas atividades diárias de acordo com critérios clínicos objetivos.....	157
Anexo E: Quadro 10. Regimes de condicionamento aplicados no TCTH dos pacientes participantes do presente estudo	158
Anexo F: Quadro 11. Tipos de TCTH e as características que condicionam as decisões na escolha para o tratamento das doenças.....	159
Anexo G: Quadro 12 (parte 1):. Citocinas - fontes e funções	160
Anexo G: Quadro 13 (parte 2):. Citocinas - fontes e funções	161
Anexo H: Quadro 14. Principais características dos epítomos.....	162
Anexo I: Quadro 15. Representação das subpopulações T e das citocinas e sua relação com eventos de DECH-C.....	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de inclusão e exclusão para o estudo	21
Tabela 2. Distribuição dos indivíduos de acordo com o sexo	55
Tabela 3. Distribuição dos linfócitos e de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis.....	58
Tabela 4. Distribuição de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis de acordo com os grupos etários	61
Tabela 5. Distribuição de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis de acordo com o sexo	61
Tabela 6. Distribuição da população em relação à doença prévia.....	63
Tabela 7. Distribuição de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis de acordo com os grupos de doenças: doenças mieloides; LLA; linfomas e MM.....	65
Tabela 8. Análise univariada e multivariada por regressão logística em relação à razão de chances (OR) para “valores baixos” de sjTREC	68
Tabela 9. Comparação de sjTREC entre pacientes de todas as idades e indivíduos saudáveis mais velhos (≥ 50 anos)	69
Tabela 10. Características dos pacientes submetidos ao TCTH-alo.....	70
Tabela 11. Risco competitivo para DECH-C de acordo com fatores pré-determinados.....	72
Tabela 12. Relação entre tempo de enxertia por tipo de TCTH e evolução de sjTREC	74
Tabela 13. Sobrevida global em pacientes submetidos ao TCTH-auto.....	77
Tabela 14. Sobrevida livre de eventos (óbito ou recaída) em pacientes submetidos ao TCTH-auto.....	78
Tabela 15. Sobrevida global em pacientes submetidos ao TCTH-alo.....	79
Tabela 16. Sobrevida livre de eventos (DECH-C, óbitos ou recaídas) em pacientes submetidos ao TCTH-alo.....	80
Tabela 17. Evolução de sjTREC ao longo do primeiro ano do TCTH.....	86
Tabela 18. Resultado das comparações múltiplas do DECH-C e da infecção em geral (bacteriana e/ou viral e/ou fúngica) segundo tipo de TCTH, presença de DECH-C e tempo (3, 6, 9 e 12 meses).....	90
Tabela 19. Distribuição dos pacientes de acordo com tempo de enxertia medular, função tímica aos 12 meses do TCTH e tipos de infecção (geral ou específica bacteriana e para o CMV).....	93
Tabela 20. Relação entre os pacientes que receberam ATG e a evolução de sjTREC...95	

Tabela 21. Relação entre os pacientes HLA e a evolução de sjTREC	96
Tabela 22. Evolução de sjTREC ao longo do tempo, interação entre os pacientes que receberam ATG e os que não receberam ATG e entre os pacientes HLA aparentados e os não aparentados	96
Tabela 23. Evolução de sjTREC ao longo do tempo entre pacientes vivos e óbitos.....	97
Tabela 24. Relação de sjTREC ao longo do tempo entre pacientes vivos e óbitos.....	97
Tabela 25. Descrição das subpopulações de células mononucleadas (linfócitos T CD3 ⁺ e CD19 ⁺ e células NK) de acordo com eventos de DECH-C e o tempo (seis aos 12 meses).....	100
Tabela 26. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) de acordo com eventos de DECH-C e o tempo (seis aos 12 meses)	101
Tabela 27. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ (ETR CD4 ⁺ e ETR CD8 ⁺) de acordo com eventos de DECH-C e o tempo (seis aos 12 meses).....	102
Tabela 28. Resultado das comparações múltiplas das populações de células estudadas em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo	103
Tabela 29. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ (<i>naive</i> , mem cen, efet, mem efet) de acordo com eventos de DECH-C e o tempo (6 aos 12 meses)	104
Tabela 30. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ (<i>naive</i> , mem cen, efet, mem efet) em estado de ativação, de acordo com eventos de DECH-C e o tempo	105
Tabela 31. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3 ⁺ CD4 ⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo, para <i>naive</i> e seu componente ativado	106
Tabela 32. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3 ⁺ CD4 ⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo, para men cen ativada e efet ativada.....	107
Tabela 33. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺ (<i>naive</i> , mem cen, efet, mem efet), de acordo com eventos de DECH-C e o tempo	108
Tabela 34. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺ (<i>naive</i> , mem cen, efet, mem efet) em estado de ativação, de acordo com eventos de DECH-C e o tempo	109
Tabela 35. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3 ⁺ CD8 ⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo	110
Tabela 36. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ de acordo com o tipo de resposta Th (Th-1, Th-2 e Th-17), com eventos de DECH-C e o tempo, para células <i>naive</i>	111

Tabela 37. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ de acordo com o tipo de resposta Th (Th-1, Th-2 e Th-17), com eventos de DECH-C e o tempo, para células men cen.....	112
Tabela 38. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ de acordo com o tipo de resposta Th (Th-1, Th-2 e Th-17), com eventos de DECH-C e o tempo, para células efet	113
Tabela 39. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ de acordo com o tipo de resposta Th (Th-1, Th-2 e Th-17), com eventos de DECH-C e o tempo, para células men efet	114
Tabela 40. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3 ⁺ CD4 ⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo	115
Tabela 41. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ de acordo com o tipo de resposta reguladora (CD4 ⁺ CD25 ⁺), com eventos de DECH-C e o tempo.....	116
Tabela 42. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3 ⁺ CD4 ⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo	116
Tabela 43. Descrição das citocinas melhor associadas ao tipo de resposta Th-1	117
Tabela 44. Descrição das citocinas melhor associadas ao tipo de resposta Th-2.....	118
Tabela 45. Descrição das citocinas melhor associadas ao tipo de resposta Th-17	119
Tabela 46. Descrição das citocinas melhor associadas ao tipo de resposta T reguladora	120
Tabela 47. Descrição das citocinas melhor associada ao macrófago (GM-CSF) ou relacionadas às respostas Th (IL-10) e T reg.....	121
Tabela 48. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3 ⁺ CD4 ⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo	122

RESUMO

Rocha LKA. *Avaliação da reconstituição da função tímica e a caracterização das subpopulações de linfócitos T e do perfil de citocinas em pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas que desenvolveram doença do enxerto-contra-hospedeiro* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2018.

O transplante de células-tronco hematopoiéticas tem sido a melhor opção terapêutica para muitas doenças. Seu sucesso, no entanto, depende de alguns fatores que influenciam a taxa de mortalidade. A doença do enxerto-contra-hospedeiro é uma causa de mortalidade. Apresenta duas formas, a aguda e a crônica, e ambas têm linfócitos T na patofisiologia. Outra causa são as infecções, cujos patógenos variam conforme o tempo de recuperação do sistema imune. O presente estudo avaliou a recuperação linfóide T com base no timo e distinção das subpopulações e citocinas nos pacientes que desenvolveram doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica no primeiro ano de transplante. Os pacientes foram alocados no Hospital de Transplante Amaral Carvalho (Jaú/SP) e tinham entre 18 e 60 anos de idade. No pré-transplante, foram comparados com indivíduos saudáveis, pareados em idade. Após o transplante, todos os pacientes foram acompanhados por um ano e seis meses, para observação de possíveis eventos de doença do enxerto-contra-hospedeiro e/ou infecções. A análise laboratorial foi feita com o sangue do paciente, sendo a primeira antes do transplante, seguidas por mais quatro, com intervalos de três meses. Tais avaliações laboratoriais tinham por objetivos caracterizar a função tímica por quantificação de sjTREC; as subpopulações de linfócitos T, por citometria de fluxo e a análise de citocinas, por Luminex. Foram estudados 172 indivíduos, sendo 75 do transplante alogênico, 43 do transplante autólogo, além de 54 pessoas saudáveis. Nossos resultados mostraram que os pacientes apresentaram função tímica diminuída antes mesmo da realização do transplante. A função tímica enfraquecida foi um fator de risco para doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica e a recuperação do sistema imune foi melhor nos pacientes que não apresentaram doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica após um ano do transplante. No entanto, a função tímica não foi diferente entre os pacientes que faleceram e os que estão vivos. No geral, não houve distinção quanto à apresentação das subpopulações de linfócitos T e à produção de citocinas entre os pacientes submetidos ao transplante alogênico que desenvolveram doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica, relativamente aos demais pacientes. Com o tempo, foi observada a recuperação gradual do compartimento linfóide T e diminuição na incidência de infecções. A taxa de infecções não influenciou a apresentação das subpopulações de linfócitos T e a produção de citocinas nos pacientes que desenvolveram doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica em relação aos demais pacientes. Como conclusão, a função tímica apresentou-se deteriorada antes da realização do transplante, porém não foi determinante para que houvesse piora na evolução clínica após o transplante. Os pacientes que desenvolveram doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica, independentemente da incidência de infecções, apresentaram semelhança no perfil das subpopulações de linfócitos T e das citocinas, quando comparados aos demais.

Descritores: antígenos HLA; citocinas; doença enxerto-hospedeiro; doenças hematológicas; linfócitos T; sistema imunológico; timo; transplante autólogo; transplante homólogo; transplante de células-tronco hematopoiéticas.

ABSTRACT

Rocha LKA. *Evaluation of thymic function recovery and characterization of T lymphocyte subpopulations and cytokines profile in patients underwent to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation that developed graft-versus-host disease* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Hematopoietic stem cell transplantation has been the best therapeutic option for many diseases. Its success depends on some factors that influence the mortality rate. Graft-versus-host disease is one cause of mortality. It has two forms, acute and chronic, and both have T lymphocytes in their pathophysiology. Other causes are infections, whose pathogens vary according to immune system recovery time. The present study evaluated the lymphoid T recuperation through the thymus and the differentiation of subpopulations and cytokines in patients who developed chronic graft-versus-host disease at the first year of transplantation. The patients were allocated at Hospital de Transplantes Amaral Carvalho (Jau/SP). They were between 18 and 60 years old. At pre-transplant phase, patients were compared to healthy individuals, age-matched. After transplantation, they were all assisted for one year and six months, so that graft-versus-host disease's and infections' events could be observed. The laboratory analysis was done by blood sample; the first occurred before the transplant, followed by four more, every three months. Laboratory examinations were performed to characterize thymic function by quantification of sjTREC; T lymphocyte subpopulations, by flow cytometry, and cytokine analysis, by Luminex. A total of 172 individuals were studied: 75 allogeneic transplant patients, 43 autologous transplant patients and 54 healthy persons. Our results showed that patients presented thymic function impaired even before the transplant. The weakening of the thymic function was a risk factor for chronic graft-versus-host disease and immune system recovery was better in patients who did not develop chronic graft-versus-host disease after one year of transplantation. However, the thymic function was not different between patients who died and those who remained alive. In general, there was no distinction of the presentation of T lymphocyte subpopulations and cytokines production among patients who underwent allogeneic transplant and developed chronic graft-versus-host disease, in comparison to the other patients. Over time, a gradual recovery of the T lymphoid compartment and a decrease in the infections incidence were observed. The infection rate did not influence the presentation of the T lymphocyte subpopulations and the production of cytokines in patients who developed chronic graft-versus-host disease in comparison to the other patients. In conclusion, the thymic function was impaired before transplantation, but it was not relevant for clinical evolution worsening after transplantation. Patients who developed chronic graft-versus-host disease, regardless of the incidence of infections, showed similar profile of T lymphocytes subpopulations and cytokines, relatively to other patients.

Descriptors: HLA antigens; cytokines; graft vs host diseases; hematologic diseases; T-lymphocytes; immune system; thymus gland; transplantation, autologous; transplantation, homologous; hematopoietic stem cell transplantation.

1 INTRODUÇÃO

O primeiro transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) foi realizado há cerca de seis décadas (1957). Na época, o procedimento foi utilizado como último recurso terapêutico, no qual foram aplicadas altas doses de quimioterapia e radioterapia em pacientes com doenças malignas consideradas incuráveis⁽¹⁾.

A única fonte de células-tronco hematopoiéticas (CTH) foi a medula óssea (MO) por vários anos. Em 1960, a coleta de CTH no sangue de cordão umbilical começou a ser considerada como alternativa⁽²⁾. No entanto, somente nos anos 1986 e 90, respectivamente, a coleta de CTH do sangue periférico estimuladas por fator estimulador de colônias de granulócitos (CTP) e do sangue do cordão umbilical obtiveram sucesso⁽³⁾.

No Brasil, o primeiro TCTH foi realizado em 1979 em Curitiba, porém, infelizmente, sem sucesso. Somente em 1981 é que foi realizado o segundo TCTH em Curitiba. Este foi o primeiro TCTH realizado com sucesso na América Latina⁽⁴⁾.

Existem dois tipos de TCTH, o alogênico, no qual as CTH advêm de outro indivíduo (TCTH-alo) e o autólogo, do próprio paciente (TCTH-auto).

Desde sua criação, o TCTH tem salvado milhões de pessoas ao redor do mundo. Só nos EUA, até o ano de 2017, foram realizados cerca de 15.000 TCTH-auto/ano e mais de 8.000 TCTH-alo/ano⁽⁵⁾.

No início, o TCTH-alo com doador totalmente compatível era a única opção terapêutica. No entanto, mais recentemente, o TCTH-alo com disparidade de antígenos HLA e o haploidêntico se tornaram realidades⁽⁶⁾.

O sistema HLA (do inglês, *human leukocyte antigen*) ou sistema antígeno leucocitário humano é um conjunto de genes que codifica o complexo principal de histocompatibilidade (CPH) ou MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*) e tem como função primordial a apresentação de antígenos. O sistema HLA situa-se no locus 21 do braço curto (p) do cromossomo 6. Os genes HLA são polimórficos, isto é, têm muitos alelos diferentes, o que promove a alta especificidade do sistema imune adaptativo⁽⁷⁾.

Os antígenos HLA de classe I (A, B, C, entre outros) têm como função apresentar antígenos intracelulares de vírus, bactérias e protozoários intracelulares, enquanto que os antígenos HLA de classe II (DP, DQ, DR) apresentam peptídeos de microrganismos extracelulares, como bactérias, fungos, parasitas e alérgenos. Na mesma região do cromossomo 6, estão presentes genes que codificam para proteínas do sistema complemento e são definidos como classe III⁽⁸⁾ (Figura 1).

Figura 1. O sistema HLA no cromossomo 6

O polimorfismo nos genes HLA representa a principal barreira para o sucesso do TCTH, o que força a seleção pelo doador com melhor compatibilidade HLA, na tentativa de reduzir o risco de perda do enxerto, doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) e mortalidade⁽⁹⁻¹¹⁾. De tal forma que, atualmente, para o TCTH-alo, a escolha entre a fonte de CTH (MO, CTP ou cordão umbilical) é crucial, além da necessidade de optar pelo tipo de TCTH-alo que esteja disponível e que tenha o menor risco de mortalidade devido a disparidades no sistema HLA, ou seja, irmão HLA idêntico ou com disparidades, doador não aparentado HLA compatível ou com disparidades, HLA haploidêntico ou ainda sangue do cordão umbilical⁽¹²⁻¹⁴⁾.

De preferência, a escolha está baseada na identificação por alta resolução dos alelos HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 e DPB1. A melhor escolha é a paridade 9/10 ou 10/10 entre o doador e o receptor. No caso de existirem opções de doadores, o melhor recrutamento é o do sexo masculino, jovem, ABO compatível e CMV negativo/negativo ou positivo/positivo entre doador e receptor⁽¹²⁻¹⁷⁾.

A escolha da fonte de células depende da escolha do doador, das preferências do centro de transplante e da indicação do TCTH. É sabido, por exemplo, que a fonte por CTP produz mais DECH. No entanto, essa escolha pode ser favorável nas doenças malignas devido ao potencial efeito enxerto versus tumor e, por consequência, na diminuição do risco de recaída, por outro lado está relacionada à menor taxa de sobrevida em doenças não malignas, em especial, a anemia aplástica⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

O sucesso no TCTH advém do contínuo avanço no entendimento da Imunologia. Os mais recentes avanços podem ser agrupados em três grandes categorias: (a) redução na taxa de morbimortalidade relacionada ao TCTH; (b) diversificação na opção de doadores; (c) redução no índice de recaída da doença que motivou a realização do TCTH⁽¹⁹⁾.

O conhecimento paulatino trouxe melhorias na profilaxia pós-TCTH, no manejo da DECH e nas estratégias de tratamento das infecções. A profilaxia antimicrobiana ou preemptiva com o uso de antibióticos de amplo espectro, antivirais e antifúngicos atualmente são condutas-padrão no mundo inteiro. O advento de novas técnicas de imagem, bem como avanços em histopatologia, microbiologia e biomarcadores permitiram o diagnóstico precoce das infecções, que resultou em redução nos índices de morbimortalidade, sobretudo em decorrência de infecções por CMV e por fungos⁽²⁰⁻²³⁾.

Os aspectos imunológicos envolvidos no TCTH têm papel central para o seu verdadeiro sucesso. Esses aspectos envolvem os mecanismos de enxertia, controle das células neoplásicas e da DECH, combate às infecções, desenvolvimento de tolerância e a reconstituição imunológica, propriamente dita, ao longo do tempo.

As CTH infundidas migram para a MO e originam os precursores mielóides e linfóides. Os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, células dendríticas, células natural killer (NK) e os linfócitos B repovoam rapidamente a MO. Os precursores linfóides T migram para o timo, no qual ocorrerá a maturação celular. A velocidade de repovoamento dependerá da intensidade do regime de condicionamento e, sobretudo, da fonte de CTH (Figura 2).

Figura 2. Célula-tronco hematopoiética e a hematopoese

Logo após o regime de condicionamento, ocorre a aplasia, caracterizada por neutropenia acentuada (fase da pré-enxertia). O número de células CD34⁺ e de células nucleadas, de acordo com a fonte de enxerto, é um importante fator que contribui para a duração dessa fase. O sangue do cordão umbilical contém menor quantidade de células nucleadas quando comparado a MO ou mesmo à coleta de CTP por aférese e isso aumenta o tempo de enxertia para 30 dias, em detrimento de 14 dias para CTP ou 21 dias para MO em geral^(24, 25).

A recuperação do sistema imunológico depende da persistência das células do sistema imune presentes no enxerto e da neogênese, que deriva das células progenitoras hematopoiéticas do doador. Esse é um processo bastante dinâmico, que compreende o restabelecimento do sistema imune inato dentro de poucas semanas, seguido do sistema adaptativo e humoral que poderá se estender por anos. Os primeiros 100 dias após o TCTH (fase de enxertia) são caracterizados por imunodeficiência celular devido ao reduzido número de células NK do sistema inato e de células T (CD4 e CD8) do sistema adaptativo^(26, 27).

A recuperação do compartimento linfoide T, mais especificamente, está baseada inicialmente na expansão periférica das células T de memória, estimuladas por citocinas e antígenos do hospedeiro, seguida da produção de células T pelo timo. O progenitor linfoide comum é a fonte das linhagens celulares precursoras das células T, B e NK. A maioria das etapas na maturação de células B ocorre na medula óssea, mas os eventos finais podem acontecer depois que as células deixam a medula e entram nos órgãos linfoides secundários, isto é, linfonodos e baço. Por outro lado, a maturação da célula T ocorre totalmente no timo e, portanto, é necessário que os progenitores linfoides migrem da medula óssea (MO) para o timo. Acredita-se que a maturação das células NK ocorra totalmente na medula óssea^(28, 29).

A proliferação e a diferenciação celular são estimuladas por citocinas. As citocinas são produzidas por células do estroma e macrófagos na medula óssea ou ainda por linfócitos T estimulados por antígenos ou macrófagos ativados por outras citocinas⁽³⁰⁾.

O processo de desenvolvimento dos linfócitos no timo apresenta etapas intrínsecas de controle, que se baseiam na produção de cadeias polipeptídicas da proteína receptora de antígenos e na construção do receptor. Esses pontos de controle asseguram que somente os linfócitos que completaram com sucesso o rearranjo genético dos receptores serão selecionados no processo de maturação.

O rearranjo de segmentos gênicos de receptores de células T (TCR) e a junção de segmentos de DNA nesse locus gerarão um gene funcional de receptores de antígenos. A maioria das células T consiste de células $T\alpha\beta$ derivadas de CTH da medula óssea, uma minoria é originária do fígado fetal, constituída de células $T\gamma\delta$. Um rearranjo fora do padrão adequado provoca a não expressão do pré-TCR e as células não recebem os sinais necessários de sobrevivência, o que induz à morte celular programada⁽³¹⁾.

Nesse processo de maturação, os linfócitos que reconhecerem com baixa afinidade antígenos próprios do MHC serão preservados e aqueles que os reconhecerem com alta afinidade poderão ser eliminados ou mesmo induzidos a alterar seus TCRs, processo denominado seleção positiva/negativa. A seleção positiva assegura a permanência do linfócito T, cuja expressão do correceptor T $CD8^+$ ou $CD4^+$ seja compatível, respectivamente, com as moléculas MHC classe I ou II, enquanto que a seleção negativa elimina os linfócitos T com potencial danoso ao organismo em virtude da autoimunidade⁽³²⁾.

Durante o processo de maturação no timo, os genes que codificam diversos receptores de antígenos dos linfócitos T são gerados pelo rearranjo dos segmentos gênicos presentes nas regiões variáveis (V), de diversidade (D) e de junção (J) presentes em cada linfócito. Um novo éxon rearranjado para cada gene de um TCR é gerado por meio da fusão de um dos segmentos gênicos da região V com um dos segmentos gênicos da região D e com um dos genes J no mesmo cromossomo, processo denominado rearranjo V(D)J. Durante o rearranjo, as sequências de sinais de recombinação (SSR), localizadas na região 3' de cada segmento gênico V, na região 5' de cada segmento J e em ambos os lados de cada segmento D sofrem quebras de tal forma que um filamento duplo de DNA é removido na forma de círculo, denominado círculo excisional do receptor de células T (TREC)⁽³³⁾ (Figura 3).

A quantificação de TREC por reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido considerada o método mais fidedigno de avaliação da função do timo porque o TREC produzido não sofre segmentação com a divisão celular e também não está presente entre os linfócitos oriundos da periferia, de tal forma que o número de TRECs quantificados reflete o de linfócitos jovens ou emigrantes tímicos recentes (ETR) saídos do timo⁽³⁴⁾ (Figura 4).

Figura 3. Rearranjo do segmento gênico V(D)J e eliminação de TREC durante processo de maturação do TCR

Figura 4. Proliferação do timócito, formação de TRECs (β e sj) e migração para o sangue periférico como ETR, onde se misturará com os linfócitos maduros já existentes

No timo, as células T (timócitos) mais imaturas estão no seio subcapsular e na região cortical externa e, para seu desenvolvimento, migram para o córtex, onde ocorre a maioria dos eventos da maturação. No córtex, os timócitos expressam os TCR $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$. Resumidamente, quando os timócitos entram no timo, não expressam os correceptores $CD4^+$ ou $CD8^+$ (timócitos duplo negativos), mas, no córtex, as células TCR passam a expressar conjuntamente $CD4^+$ e $CD8^+$ (timócitos duplo positivos) e com a maturação em desenvolvimento, os timócitos migram para a medula e deixam o timo com correceptor $CD4^+$ ou $CD8^+$ (timócitos simples positivos), sendo denominados linfócitos T virgens ou naturais (*naive*) ou ainda ETR. Durante todo o processo de desenvolvimento dos timócitos, em torno de 95% deles irão sofrer processo de apoptose, restando somente entre 3-5% de ETR com TCR $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$, que realmente partem do timo para o sangue periférico, sendo que somente 10% dos ETR serão liberados com TCR $\gamma\delta$, a maioria terá TCR $\alpha\beta$ ⁽³⁵⁾ (Figura 5).

Figura 5. Processo de maturação do linfócito T (ou timócito) no timo

Os ETR T CD4⁺, uma vez na circulação, podem ser ativados por antígenos a se diferenciarem em células T auxiliares (*helper*) (linf T CD4⁺), cujas funções efetoras são mediadas por proteínas específicas de membrana ou citocinas, enquanto que os ETR T CD8⁺ podem se diferenciar em linfócitos T citotóxicos (linf T CD8⁺), cuja principal função efetora consiste em destruir as células-alvo infectadas. Tanto os linfócitos T CD4⁺ quanto T CD8⁺ têm origem no timo (linf T *naive*) e podem se tornar linfócitos efetores na periferia, após encontro com antígeno (linf T efet)⁽³⁶⁾.

Os linfócitos T são caracterizados por expressarem determinadas moléculas de superfície e secretarem citocinas que ativam outras células (linfócitos B, macrófagos e células dendríticas). Existem três subtipos distintos de respostas imunes dos linf T CD4⁺, a saber, resposta tipo Th-1, Th-2 ou Th-17, que estão envolvidas na defesa de diferentes tipos de infecções e de lesão tecidual. As características que os definem e os distinguem são as citocinas produzidas, os fatores de transcrição que expressam e as alterações epigenéticas nos *loci* genéticos de cada citocina⁽³⁷⁾ (Figura 6).

Figura 6. Exposição do ETR ao antígeno e formação dos linfócitos T efetores e de memória CD4⁺ e CD8⁺

Em geral, a resposta imune adaptativa Th-1 reconhece antígenos microbianos que são fagocitados e vivem dentro dos fagossomos dos macrófagos e ativa os fagócitos para destruírem os micro-organismos ingeridos. A resposta Th-2 atua, principalmente, contra helmintos e a resposta Th-17 atua contra agentes extracelulares, como fungos e bactérias. As citocinas mais características para resposta Th-1 são a IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α , para resposta Th-2 a IL-4, IL-5 e IL-13 e para Th-17 a IL-6 e IL-17⁽³⁸⁾ (Figura 7).

Figura 7. Tipos de respostas imunes de acordo com o agente (antígeno) em exposição

As respostas imunes mediadas pelas células T a um antígeno resultam na geração de células T de memória específicas (linf T mem), as quais podem persistir por anos. As propriedades que as definem são a sua capacidade de sobreviver em estado de quiescência após o antígeno ter sido eliminado e de proporcionar respostas mais rápidas em relação aos ETR frente à nova exposição de antígenos assemelhados.

Os linf T mem podem ser subdivididos de acordo com suas funções e endereçamento, como segue: (1) linf T mem cen (centrais), quando expressam CCR7 e selectina-L e migram para linfonodos periféricos. Em contato com antígeno, têm grande

capacidade de proliferação e geração de células efetoras; (2) linf T mem efet (efetoras) que não expressam CCR7 e selectina-L e migram para sítios periféricos, principalmente mucosas, e com a estimulação antigênica produzem citocinas como IFN- γ ou se tornam células citotóxicas⁽³⁹⁾.

O controle da resposta linfóide efetora aos antígenos ocorre por meio de um mecanismo de tolerância. O mecanismo de tolerância central é a indução de apoptose, ou modificação do receptor do timócito, que reconhece com alta afinidade os antígenos próprios ao organismo, ou ainda, o desenvolvimento de linf T reg. O mecanismo de tolerância periférica ocorre pela indução do linfócito também para o mecanismo de morte celular (apoptose) ou modificação do TCR, o que impede o reconhecimento do antígeno (anergia) ou ainda pela inibição por ação dos linfócitos T regulares (linf T reg) (supressão)⁽⁴⁰⁾ (Figura 8).

Figura 8. Mecanismos de tolerância dos linfócitos T

A maioria dos linf T reg expressa altos níveis da cadeia α (CD25) do receptor da IL-2. Um fator de transcrição (FoxP3), membro da família *forkhead*, é crítico para o

desenvolvimento e a função da maioria dos linf T reg⁽⁴¹⁾. As principais citocinas expressas na ativação de linf T reg são as isoformas de TGF- β (1,2 e 3)⁽⁴²⁾.

Os linf T CD4⁺ somente alcançarão níveis normais após quase um ano do TCTH, com diversificação maior entre os seus subgrupos até quatro anos após o TCTH. Nos TCTH depletados de linf T, por exemplo, como não há expansão homeostática periférica e grande parte de sua reconstituição irá depender da diferenciação dos linfócitos no timo, que estará com suas funções prejudicadas pelo regime de condicionamento, o período de recuperação poderá ainda ser mais prolongado. Esse dano é aumentado na incompatibilidade HLA, pois a diferenciação tímica depende da compatibilidade HLA entre linfócitos do doador e o ambiente tímico do receptor, isto é, células dendríticas e o epitélio⁽⁴³⁾.

A análise histológica do timo, em modelos murinos, revelou que ocorre uma desorganização arquitetural e decomposição do microambiente frente a eventos de DECH agudo (DECH-A). As células epiteliais são bastante prejudicadas e isso afeta diretamente a expansão, diferenciação e seleção dos timócitos. Quanto mais o timo é afetado, maiores serão as chances do surgimento de linfócitos alo-reativos e as reações de autoimunidade que precedem ou se relacionam com eventos de DECH crônico (DECH-C)⁽⁴⁴⁾ (Figura 9).

Historicamente, a DECH é separada em fase aguda e fase crônica. Teoricamente, a DECH-A ocorre antes dos 100 dias do TCTH, enquanto que a DECH-C após os 100 dias. No entanto, podem ocorrer casos de DECH-A após 100 dias de TCTH e DECH-C antes dos 100 dias.

A DECH-A permanece como a principal causa direta ou indireta de óbito relacionado ao TCTH. A patofisiologia da DECH-A compreende três fases: (a) dano tecidual inicial devido ao regime de condicionamento que ativa as células apresentadoras de antígenos; (b) ativação e proliferação de linf T efet (fase aferente) e (c) liberação de citocinas inflamatórias, tais como a IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF- α), que podem induzir a necrose tecidual (fase eferente). Essas fases são moduladas pelos linf T reg. O maior risco de DECH-A é a disparidade HLA, entretanto, outros fatores de risco também podem ser considerados, tais como idade avançada do paciente ou do doador, doador feminino para receptor masculino, aloimunização prévia do doador, profilaxia para DECH, intensidade do regime de mieloablação, receptor soropositivo para citomegalovírus (CMV)⁽⁴⁵⁾.

a

b

Imagens cedidas por Castelli, JB (setor de patologia e TCTH, HC-FMUSP) (aumento de 40x)

Figura 9. a) DECH, exemplo de infiltrado linfocitário em DECH-A na epiderme e derme (H&E)
b) reação por imunohistoquímica com anticorpo anti-CD8⁺, agressão aos queratinócitos por linfócitos T

A DECH-C é a principal causa de morbimortalidade tardia não relacionada à recaída tumoral, principalmente, por propiciar o surgimento de infecções. A patofisiologia da DECH-C é menos entendida e, embora apresente características de DECH-A, pelo envolvimento de linfócitos autorreativos, os linfócitos B também estão presentes. A DECH-C apresenta características tanto de autoimunidade como de imunodeficiência e pode lembrar características histológicas de síndrome de Sjögren, esclerodermia, cirrose biliar primária e imunocitopenias. Os fatores de risco conhecidos para DECH-C são eventos prévios de DECH-A, idade avançada do paciente, esplenectomia prévia, soropositividade para CMV, doador feminino para receptor masculino e enxertia por CTP⁽⁴⁶⁾.

Os pacientes que desenvolvem DECH, seja aguda ou crônica, apresentam risco maior para o surgimento de infecções. Ademais, a própria deficiência do sistema imunológico que está em recuperação após o TCTH pode propiciar o surgimento dos mais diversos tipos de infecções.

Ao longo do tempo de recuperação celular e imunológica ocorre alteração na prevalência dos potenciais agentes infecciosos, em diferentes fases, que serão abaixo relatadas.

Fase I ou de pré-enxertia: durante o primeiro mês pós-TCTH, os pacientes têm dois fatores críticos para infecção: neutropenia prolongada e quebra da barreira mucocutânea. Por consequência, agentes da flora cutânea e gastrointestinal são as principais fontes de infecção. Patógenos mais prevalentes incluem *Candida sp* e *Aspergillus sp*. A reativação do herpes simples também pode ocorrer. O risco é semelhante entre o TCTH-alo e o TCTH-auto. Muito embora a probabilidade de que, diante de uma infecção, o primeiro agente seja uma bactéria, raramente essa é identificada e, então, o tratamento ocorre de forma preemptiva ou empírica⁽⁴⁷⁾.

Fase II ou pós-enxertia: essa fase é caracterizada pela deficiência da imunidade celular mediada. Os vírus da família *Herpesviridae*, particularmente o CMV, são patógenos críticos nesta fase entre 30-100 dias, principalmente, entre os pacientes que desenvolverem DECH. Outros agentes prevalentes são *Pneumocystis carinii* e *Aspergillus sp*⁽⁴⁸⁾.

Fase III ou tardia: nesse período existe uma deficiência do sistema reticuloendotelial e uma disfunção da imunidade humoral e celular mediada. Os pacientes mais propensos são os que desenvolvem DECH-C, os pacientes submetidos ao TCTH HLA não idêntico ou que receberam, como fonte de CTH, o sangue do cordão umbilical⁽⁴⁹⁾. Os principais agentes que acometem os transplantados nessa fase são CMV, varicela zoster vírus (VZV), Epstein Barr vírus (EBV), vírus respiratórios da comunidade e bactérias encapsuladas (*Haemophilus influenzae* e *Streptococcus*

pneumoniae, entre outros agentes). O risco é maior entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo do que ao TCTH-auto. Entre os TCTH-alo, aqueles submetidos a maior grau de disparidade HLA têm maior risco para DECH-C de maior intensidade⁽⁵⁰⁾. Os pacientes TCTH-alo que apresentaram DECH-A II-IV são os que têm maiores riscos de infecções nessa fase do TCTH⁽⁵¹⁾ (Figura 10).

Figura 10. Prevalência de agentes infecciosos de acordo com as fases do TCTH

A literatura médica tem demonstrado que a recuperação imunológica difere entre os pacientes e isso pode contribuir como risco aumentado, tanto para o surgimento de DECH quanto de infecções. Por esse motivo, cada vez mais, o timo têm sido estudado, seja por meio do estudo por imagem, por citometria de fluxo ou por biologia molecular⁽⁵²⁾.

Mais especificamente, a quantificação de TREC tem sido utilizada para estudar a função tímica em várias situações clínicas, tais como: deficiências congênitas, vírus da imunodeficiência humana (HIV), doenças autoimunes e o transplante (hematológico ou de órgãos sólidos)⁽⁵³⁾.

Existem alguns relatos na literatura que relacionam a quantificação mais baixa de TREC com eventos de DECH e com infecções, ou seja, níveis mais baixos de TREC nos pacientes submetidos ao TCTH estariam associados com função tímica mais deteriorada e, por consequência, maior risco para o surgimento dessas complicações, as quais têm influência direta na taxa de sobrevida global^(54,55). No entanto, até o momento, não existem relatos que tenham estudado de maneira simultânea a recuperação da função tímica e a apresentação dos subtipos de linfócitos T e seus subprodutos, as citocinas, em complicações tardias no pós-TCTH.

O presente estudo visou observar a recuperação imunológica no TCTH-alo, com discernimento entre os pacientes que apresentaram DECH-C em relação aos que não tiveram essa complicação ao longo do primeiro ano do TCTH. Ademais, buscou-se caracterizar o compartimento linfoide e a produção das citocinas em uma fase mais tardia do TCTH (seis meses) até o seu primeiro ano, com o objetivo de distinguir a forma de apresentação entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo que apresentaram DECH-C em relação aos que não tiveram DECH-C e, também, em relação aos pacientes submetidos ao TCTH-auto (grupo controle).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral ou primário

Avaliar, durante o primeiro ano após o TCTH-alo, a recuperação da função do timo, por meio da quantificação de sjTREC e discriminar as subpopulações de linfócitos T e a produção de citocinas entre seis meses e um ano, nos pacientes submetidos ao TCTH-alo que desenvolveram DECH-C e comparar os resultados com aqueles encontrados em pacientes submetidos ao TCTH-alo que não desenvolveram DECH-C e em pacientes submetidos ao TCTH-auto.

2.2 Específicos secundários

- a) Estimar a produção tímica (sjTREC) em uma amostra da população brasileira e comparar com os pacientes em situação anterior ao TCTH;
- b) Estimar possíveis fatores de risco para eventos de DECH-C;
- c) Relacionar eventos de infecção entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo (com e sem DECH-C) e comparar com os pacientes submetidos ao TCTH-auto;
- d) Avaliar a incidência cumulativa de DECH-A, DECH-C e infecções bacterianas e por CMV ao longo do tempo de acordo com a quantificação de sjTREC;
- e) Analisar a sobrevida global dos pacientes por grupos;
- f) Analisar a sobrevida livre de eventos de DECH-C, óbito ou recaída nos pacientes submetidos ao TCTH-alo;
- g) Analisar a sobrevida livre de eventos de óbito ou recaída nos pacientes submetidos ao TCTH-auto;
- h) Comparar a recuperação da função do timo entre os pacientes vivos e os que faleceram e também entre os que receberam globulina antitimócitos (ATG) e os que não receberam ATG no decorrer do TCTH;
- i) Comparar a apresentação quantitativa da população linfocitária T CD3⁺ com as populações de linfócitos B CD19⁺ e células NK CD56⁺ entre seis meses e um ano do TCTH, entre três grupos de interesse: TCTH-alo (com DECH-C), TCTH-alo (sem DECH-C) e TCTH-auto.

3 MÉTODOS

3.1 Modelo do estudo

É um estudo de coorte prospectivo, com seguimento clínico-laboratorial de um ano e seis meses após a realização do TCTH.

Foram acompanhados dois grupos de pacientes, um grupo submetido ao TCTH alogênico (grupo alvo) e outro grupo submetido ao TCTH autólogo (grupo controle). O estudo envolve um ano de coleta trimestral de amostras de sangue venoso periférico e mais a análise de prontuário e coleta dos dados clínicos ao longo de um ano e seis meses após o TCTH. A primeira coleta ocorreu entre 30 e 15 dias antes da realização do TCTH, neste momento o grupo de pacientes foi comparado com um grupo de indivíduos saudáveis, doadores de sangue em agência de transfusão (Figura 11).

Figura 11. Desenho do estudo: o estudo inicia com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) durante a avaliação do paciente antes da realização do TCTH e segue com o acompanhamento observacional por um ano e seis meses após o TCTH. A coleta amostral iniciou no pré-TCTH, durante a seleção dos pacientes, seguida de mais quatro coletas trimestrais até o fim do primeiro ano. As análises são por qPCR (sjTREC), citometria de fluxo (subpopulações de linfócitos) e Luminex® (citocinas). A avaliação clínica seguiu pelo menos seis meses após a última coleta amostral

3.2 Inclusão de pacientes

Para o grupo-alvo de estudo, foram inclusos somente aqueles que apresentavam diagnóstico prévio de leucemia aguda (linfoide ou mieloide) ou mielodisplasia e que foram submetidos ao TCTH-alo com HLA idêntico (oito alelos idênticos em oito testados [8/8] para o TCTH aparentado; ou dez alelos idênticos em dez testados [10/10] para o TCTH não aparentado). A tipagem HLA foi realizada para as classes I e II, exceto o HLA-DP. No caso de paciente com doador HLA aparentado, foi utilizada tipagem HLA-A e -B em baixa resolução e -DR e -DQ em alta resolução, já nos pacientes não aparentados, foram utilizados HLA-A, -B, -C, -DR e DQ em alta resolução.

Para o grupo controle, foram inclusos aqueles pacientes que apresentaram diagnóstico prévio de linfoma (Hodgkin ou não Hodgkin) ou mieloma múltiplo. Todos os pacientes inclusos tinham entre 18 e 60 anos de idade no momento do TCTH. Nenhum paciente era HIV positivo, esplenectomizado ou timectomizado, cujas situações clínicas díspares poderiam afetar na maturação ou proliferação do linfócito. Nenhum paciente recebeu infusão de linfócitos do doador após o TCTH. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado em todos os indivíduos.

Não foram inclusos aqueles pacientes que, no momento do TCTH, apresentassem grau acentuado de deterioração clínica devido ao tratamento quimioterápico prévio, atividade da doença ou devido a infecções prévias, pois são situações clínicas que aumentam as chances de infecções mais graves ou mesmo óbito logo após o TCTH. (Tabela 1 e Quadro 1).

Tabela 1. Critérios de inclusão e exclusão para o estudo

Tipo de TCTH	Alogênico	Autólogo	Alo e/ou Auto
CRITÉRIOS	INCLUSÃO	INCLUSÃO	EXCLUSÃO
Doença prévia	Leuc. aguda ou SMD	Linfomas ou MM	Outras doenças
Idade	18 a 60 anos	18 a 60 anos	<18 ou >60 anos
HLA	Idêntico	Não se aplica	Não idêntico
Esplenectomia	Não	Não	Sim
Timectomia	Não	Não	Sim
HIV +	Não	Não	Sim
ECOG >1	Não	Não	Sim
DLI	Não	Não	Sim
TCLE assinado	Sim	Sim	Não

Legendas: Alo: alogênico; Auto: autólogo; DLI (do inglês: *donor lymphocyte infusion*): infusão de linfócitos do doador; ECOG*: Eastern Cooperative Oncology Group; HIV: vírus da imunodeficiência humana adquirida; HLA: antígeno humano de histocompatibilidade; Leuc: leucemia; MM: mieloma múltiplo; SMD: síndrome mielodisplásica; TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Quadro 1. Classificação utilizada para avaliação clínica dos pacientes para ingresso no estudo⁽⁵⁶⁾

Graduação	ECOG (performance clínica)
zero	Ativo, sem restrições.
1	Atividades limitadas nos "esforços pesados", mas frequente consultas.
2	Atividades limitadas nos "esforços leves e pesados", mas frequente consultas.
3	Incapaz para qualquer grau de esforço físico.
4	Confinado ao leito.
5	Óbito.

Legenda: ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

3.2.1 Amostras de sangue

Foram coletadas amostras de sangue venoso dos pacientes ao longo do primeiro ano do TCTH. As coletas ocorreram durante: (1) a avaliação ambulatorial pré-TCTH do paciente, (2) a internação para a realização do TCTH e (3) no seguimento ambulatorial após o TCTH.

A separação de plasma, extração de DNA, congelamento e registro das amostras ocorreram no setor Citoquímica; o processamento das amostras para o estudo por citometria de fluxo ocorreu no setor Biologia Molecular, ambos localizados no Hospital Amaral de Carvalho (Jaú/SP). A quantificação de sjTREC por qPCR e o estudo das citocinas por Luminex ocorreram, respectivamente, nos setores de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) e no Laboratório de Análises Especiais do Departamento de Patologia (LAE – LIM03), ambos da FMUSP (São Paulo/SP).

Nos tempos 1 (pré-TCTH) e 2 (3 meses pós-TCTH): 1 tubo a vácuo com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (volume 4mL) contendo, em média, 3mL de sangue total foi utilizado para a realização da extração de DNA. Logo após a extração, o DNA foi congelado em freezer -20°C para posterior quantificação do sjTREC por qPCR.

Nos tempos 3 a 5 (seis, nove e 12 meses pós-TCTH): três tubos com EDTA foram utilizados, cada um com uma finalidade: (a) um tubo para a extração de DNA, (b) um tubo para centrifugação, separação de plasma e congelamento em freezer -80°C para posterior quantificação de citocinas pelo método Luminex® e (c) um tubo para análise “a fresco”, para quantificação das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo (Figura 12).

As coletas amostrais ocorreram de forma trimestral, no entanto, existiu o problema do retorno ambulatorial do paciente. A maioria dos pacientes envolvidos no presente estudo pertence ao SUS e muitos deles não moram no estado de São Paulo.

Coleta amostral

Sangue total em tubo EDTA com volume médio coletado de 3mL

- (1) De forma imediata:
Separação de plasma e congelamento a -80°C
Processamento da amostra para Citometria de fluxo
- (2) Em até 1 semana:
Extração do DNA e congelamento a -20°C
- (3) Posteriormente:
Análise do plasma por Luminex[®]: Depto. Patologia (LAE/LIM03) – FMUSP
Análise do DNA por qPCR: Disciplina de imunologia (InCor) – FMUSP
Análise celular por citometria de fluxo: Biol. Molecular – Hosp. Amaral Carvalho Jaú/SP

Legendas: EDTA: do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*; FMUSP: Faculdade de medicina da Universidade São Paulo

Figura 12. Fluxograma das amostras – desde as coletas até sua análise em citometria de fluxo, Luminex[®] e qPCR – etapas 1, 2 e 3

O retorno ambulatorial dependeu de uma série de fatores, tais como liberação de passagem aérea de seu estado de origem para o estado de São Paulo e vice-versa, mais as passagens de ônibus entre as cidades, vaga nas casas de apoio, situações particulares do próprio indivíduo ou de sua família, internações clínicas inesperadas e o volume de agendamento ambulatorial disponível para determinada data. Por isso, a data ideal das coletas amostrais (três, seis, nove ou 12 meses pós-TCTH) foi programada no momento da realização do TCTH de cada paciente, mas também foi estabelecida uma variação em dias (± 20 dias) a partir da data ideal para obter-se um número mínimo de perdas amostrais (Figuras 13 e 14).

Legenda: TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Figura 13. Fluxo de coleta amostral de acordo com o período do TCTH

Figura 14. Distribuição dos pacientes de acordo com o estado de origem

3.3 Indivíduos saudáveis

Além das coletas amostrais em pacientes submetidos ao TCTH, também foi coletada uma amostra de sangue total em tubo EDTA ($\pm 3\text{mL}$) de indivíduos saudáveis.

As coletas ocorreram em locais de doação voluntária de sangue (agências transfusionais vinculadas à empresa COLSAN - Associação Beneficente de Coleta de Sangue). A escolha dos voluntários ocorreu de acordo com a faixa etária dos pacientes envolvidos no presente estudo.

O objetivo destas coletas foi estabelecer uma mediana em indivíduos saudáveis e, assim, comparar com os pacientes na situação pré-TCTH. Dessa forma foi possível estabelecer uma variação normal na população brasileira saudável e verificar a influência da idade sobre a função tímica, com distinção entre os indivíduos que foram submetidos a tratamento da doença prévia ao TCTH em relação aos indivíduos saudáveis.

As coletas de sangue ocorreram em grupos de seis indivíduos saudáveis, sendo três do sexo feminino e três do sexo masculino, com progressão da faixa etária a partir dos 18 anos e com variação a cada cinco anos de idade. O total de amostras obtidas foi de 54. Para tal feito, as amostras de sangue foram coletadas em 27 indivíduos do sexo masculino e mais 27 indivíduos do sexo feminino, em idades que variaram de 18 a 60 anos (Figura 15).

Figura 15. Distribuição de acordo com a faixa etária dos indivíduos saudáveis (18-60 anos) captados para coletas amostrais

3.4 Avaliação laboratorial

3.4.1 Citometria de fluxo e subpopulações de linfócitos

A avaliação laboratorial em citometria de fluxo se inicia com a marcação e coloração das células e segue com a aquisição em citômetro de fluxo e análise dos dados em software apropriado.

No presente estudo, duas técnicas foram empregadas para marcação das células: a) para a coloração e aquisição dos marcadores de superfície e b) para a coloração e aquisição do anticorpo conjugado anti-humano FoxP3.

Em cada amostra de paciente foram utilizados seis tubos de ensaio, sendo que cada tubo de ensaio continha além do sangue do paciente, anticorpos marcados com fluorocromos pré-estabelecidos (Quadro 2).

Quadro 2. Distribuição dos anticorpos de acordo com os fluorocromos e os tubos de ensaio

Fluorocromos	FITC	PE	PERCyP 5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
Ensaio								
1	CD8	CD56	CD19				CD4	CD3
2	HLA-DR	CCR7 (CD197)		CD8	CD45RA	CD38	CD4	CD3
3		CCR7 (CD197)	CXCR3 (CD183)	CCR6 (CD196)	CD45RA		CD4	CD3
4	CD8	CD31			CD45RA		CD4	CD3
5	HLA-DR	FoxP3	CD127	CD45RO	CD25		CD4	CD3
6		FoxP3 isotipo						

Legendas: APC: alofocianina; APC-H7: utiliza cianina análoga ao APC-Cy7; CD (do inglês, cluster of differentiation): grupamento de diferenciação; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PERCyP: complexo peridrina-clorofila-proteína; PE-Cy7: complexo conjugado ficoeritrina-cianina7; V450 reagentes demonstram características espectrais semelhantes, porém melhores do que os reagentes Pacific Blue™ (absorção máxima de 404nm e pico de emissão de 448nm) para laser violeta; V500 reagentes demonstram características espectrais semelhantes, porém melhores do que os reagentes Pacific Orange™ e AmCyan (absorção máxima de 415nm e pico de emissão de 500nm) para laser violeta. Fabricante: BD

De acordo com a técnica empregada para os marcadores de superfície foi adicionado o volume de anticorpos padronizados previamente ao sangue do paciente; misturado e incubado, sem luz, em temperatura ambiente (TA) por 30min. Foram adicionados 2mL de solução BD FACS™ Lysing em 1/10 de água destilada; nova mistura e incubação por mais 10 minutos em TA sem luz, seguiu-se por centrifugação durante 5min (540g) e o sobrenadante descartado com pipeta Pasteur, porém foi deixado um volume residual de 50µL para manter o sedimento; foram, então, adicionados 2mL de PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) mais BSA 0,5% (do inglês, *bovine serum albumin*) para a formação do *pellet*. Nova mistura e centrifugação por mais 5min (540g) e novo descarte do sobrenadante, mantendo 50µL de volume residual; houve ressuspensão com 300µL da solução BPS e BSA 0,5% e, por fim, ocorreu a aquisição imediata das células ou seu armazenamento por até 1h a 4 °C para posterior leitura no citômetro⁽⁵⁷⁾.

Em relação à identificação do anticorpo conjugado anti-humano FoxP3, foram anticorpos monoclonais de coloração de superfície em tubo de 12x75mm e mais 100µL do volume celular em estudo na proporção 1x10⁷ céls/mL. Os tubos foram submetidos ao vórtex e incubados por 20min em TA, protegido da luz; foi adicionado 2mL de tampão de lavagem, centrifugado em 250g por 10min e removido o tampão de lavagem; para fixar as células, o *pellet* (ou, neste caso, sedimento) foi ressuspensão com tampão de lavagem e adicionado 2mL do *buffer* A FoxP3 humano (1x); na sequência ocorreu novo

vórtex e nova incubação por mais 10min em TA, protegido da luz. Em nova etapa, o *buffer* foi removido, o *pellet* novamente foi ressuspensão com tampão de lavagem e foram adicionados 0,5mL do *buffer* C FoxP3 humano (1x) para ocorrer a permeabilização celular, houve novo vórtex e incubação por mais 30min em TA, protegido da luz. Posteriormente, foi adicionado FBS (sigla em inglês para *Pharmingen Stain Buffer*, produto da empresa BD) para lavar as células e o volume foi submetido à centrifugação (500g) por 5min em TA, na sequência o *buffer* foi removido e essa etapa novamente repetida, seguida de nova remoção do *buffer*; o anticorpo conjugado FoxP3 foi adicionado para ressuspender o *pellet*; novo vórtex e incubação por mais 30 min em TA e protegido da luz. Ocorreu repetição dos passos a partir da adição do FBS até a adição do anticorpo conjugado FoxP3 e nova incubação. Por fim, o *pellet* foi ressuspensão e o conteúdo imediatamente adquirido para leitura em citômetro⁽⁵⁸⁾.

A análise dos subtipos celulares ocorreu pelo estudo das células (eventos). Foram adquiridos os eventos com objetivo de alcançar 1.000.000 /tubo.

A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Bioscience)TM, utilizando o software FACS Diva (BD)TM. O software Infinicity (Cytognos)TM foi utilizado para a análise dos dados.

A linha de análise seguiu conforme fluxograma abaixo (Figura 16):

Figura 16. Fluxograma de pesquisa das populações de linfócitos T e subpopulações, linfócitos B e células NK

O objetivo foi identificar as diferentes subpopulações de linfócitos T, a seguir: a) CD3 (linf T), CD19 (linf B) ou CD56 CD (célis NK); b) CD4 (linf T auxiliares) ou CD8 (linf T citotóxicos); c) CD45RA e CD31 (linf T ETR); d) CD25, CD127, FoxP3 (linf T reg) f) CD45RO (linf T reg *naive* ou mem); h) CD45RA e CCR7 (linf T *naive* ou T mem cen ou T efet ou T men efet); e) HLA-DR e CD38 (linf T *naive* ou T mem cen ou T efet ou T men efet ou T reg em estado de ativação) e f) CXCR3 e CCR6 (linf T *naive* ou T mem cen ou T efet ou T men efet com características fenotípicas direcionadas para resposta tipo Th1, Th2 ou Th17) (Figura 17).

Como estratégia de análise dos linfócitos e suas subpopulações, primeiramente foi realizada a identificação das populações de linfócitos T, B e NK do total de eventos adquiridos (Figuras 17a-c); na sequência, a identificação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e seus respectivos ETR (Figuras 17 d-e2), seguiu-se, então, a identificação das subpopulações mem efet, efet, *naive* e mem cen dos Linf T CD4⁺ e CD8⁺ e as células em estado de ativação (Figuras 17 f-i4); após, a identificação das subpopulações de linf T CD4⁺ relacionadas às respostas Th-1, Th-2, Th-17 e resposta reguladora (Figuras 17 j-n) e, por fim, o controle isotipo para o FoxP3 (Figuras 17 l-07) encerram a análise^(59, 60).

Figura 17a. Identificação da população de interesse de acordo com a dispersão frontal (FSC – *forward scatter*) e lateral (SSC – *side scatter*)

Figuras 17b-c. Identificação dos linfócitos T CD3⁺, B CD19⁺ e célula NK CD56⁺

Figuras 17d-e2. Identificação dos linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ ou CD8⁺ e dos ETR CD3⁺ CD4⁺ ou CD8⁺

g1

g2

Figuras 17f-g4. Identificação dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺: mem efet CCR7^{neg}CD45RA^{neg}, efet CCR7^{neg}CD45RA⁺; naive CCR7⁺CD45RA⁺; Mem Cen CCR7⁺ CD45RA^{neg}, e suas células em estado de ativação HLA-DR⁺ e CD38⁺

i2

i3

i4

Figuras 17h-i4. 7h-i4. Identificação dos linfócitos T CD3⁺CD8⁺: mem efet CCR7^{neg}CD45RA^{neg}, efet CCR7^{neg}CD45RA⁺; *naive* CCR7⁺CD45RA⁺; mem cen CCR7⁺CD45RA^{neg} e suas células em estado de ativação HLA-DR⁺ e CD38⁺

j

Figuras 17j-k4. Identificação dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺: mem efet CCR7^{neg}CD45RA^{neg}; mem cen CCR7⁺CD45RA^{neg}; *naive* CCR7⁺CD45RA⁺; efet CCR7^{neg}CD45RA⁺; e as respectivas respostas Th-1 CXCR3⁺CCR6^{neg}, Th-2 CXCR3^{neg}CCR6^{neg} e Th-17 CXCR3^{neg}CCR6⁺

Figuras 17l-n. Identificação dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺: Regulador CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ e os subtipos *naive* CD45RO^{neg} e mem CD45RO⁺ em seus estados de ativação HLA-DR⁺

o2

o3

o4

o5

Controle isotipo PE-A

Controle isotipo PE-A

Figuras 17o1-7. Identificação do controle isotipo para o FoxP3

3.4.2 Luminex[®] e citocinas

O ensaio pela tecnologia xMAP (*Multiple Analyte Profiling*) da Luminex[®] ou simplesmente “ensaio Luminex[®]” é um método multiplex que possibilita quantificar várias citocinas ao mesmo tempo. A tecnologia xMAP da Luminex[®] tem o princípio similar ao “ELISA sanduíche”, pois utiliza microesferas coloridas fluorescentes (*beads*) que se ligam aos anticorpos de captura, que são colocados diretamente contra o biomarcador desejado. O resultado final é obtido após incubação do complexo com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina, que emitirá sinais fluorescentes os quais serão captados por dois lasers: o vermelho que identifica e classifica a microesfera, e o verde que quantifica a concentração dos biomarcadores. Uma câmera captura esses dados e os envia a um software para análise.

Para dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α e TGF- β foram utilizados kits comerciais Bio-plex Pro Human Cytokine e Bio-plex Pro TGF- β 3-plex (Bio-rad Laboratories, Minneapolis, MN, USA).

Para a realização do ensaio, as amostras foram descongeladas e centrifugadas em temperatura ambiente. Para a reconstituição do padrão, diluição seriada para curva-padrão, diluição de microesferas, amostras, anticorpos, estreptavidina-ficoeritrina, solução de lavagem e ativação e inativação foram seguidas as instruções de acordo com o fabricante^(61, 62).

Sucintamente, foram pipetadas microesferas coloridas revestidas com anticorpos de captura contra os biomarcadores de interesse (uma placa para TGF- β e outra para os demais). A seguir, foram acrescentadas as amostras dos pacientes, controles e curva-padrão. Após lavagens, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa e deixado um período de incubação. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex PRO II Wash Station), com as microesferas mantidas retidas na placa pela ação de um ímã. Foi adicionada, posteriormente, a estreptavidina-ficoeritrina e submetida à nova incubação. Foram feitas lavagens para remoção dos reagentes não aderidos e adição de solução tampão. As concentrações das amostras foram estimadas com base na curva-padrão. A leitura ocorreu no equipamento Magpix Milliplex, com software XPONENT 4.2 (Luminex Corp. Austin, TX) e análise no software Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore). Os níveis das citocinas foram expressos em pg/mL, de acordo com a curva de cada analito (Figura 18).

Figura 18. Exemplo de curva do ensaio Luminex® – Curvas das citocinas TGF-β1 e IFN-γ

Os limites de detecção das citocinas de interesse do estudo foram: IL-2 (1,03-16.835pg/mL), IL-4 (0,27-4.445pg/mL), IL-5 (1,41-23.039pg/mL), IL-6 (9,23-37.810pg/mL), IL-10 (2,1-34.472pg/mL), IL-12p70 (2,32-38.074pg/mL), IL-13 (0,46-7.529pg/mL), IL-17a (1,72-28.240pg/mL), GM-CSF (0,78-12.844pg/mL), IFN-γ (1,73-28.395pg/mL), TNF-α (3,85-63.082pg/mL), TGF-β1 (0,87-14.322 pg/mL), TGF-β2 (1,53-25.119pg/mL) e TGF-β3 (0,54-11.392pg/mL). Para os ensaios realizados, a curva foi ajustada para o método cúbico que apresentou os resultados mais evidentes, o que possibilitou ampliar a detecção dos valores abaixo e acima da curva-padrão.

Para efeitos didáticos, as citocinas foram arbitrariamente separadas de acordo com a maior representatividade entre os tipos de respostas *helper*, ou seja, a citocina IL-12 como indutora de resposta Th-1 e as citocinas INF-γ e TNF-α como respostas Th-1; IL-4 como indutora de resposta Th-2 e as citocinas IL-5 e IL-13 como respostas Th-2; IL-6 como indutora de resposta Th-17 e a citocina IL-17 como resposta Th-17; IL-2 como indutora de resposta T reg e as citocinas TGF-β subtipos 1,2 e 3 como resposta T reg; as citocinas GM-CSF como respostas à ativação macrófagica e IL-10 como resposta para Th-1, Th-2 e T reg. Com a ressalva em relação a IL-2, pois embora também atue na resposta tipo Th-1, foi considerada na resposta tipo T reg para fins didáticos.

3.4.3 qPCR e o sjTREC

Todas as amostras submetidas para a análise em qPCR tiveram seu DNA extraído por um Kit de Extração (QIAamp®), conforme protocolo do fabricante (Qiagen®)⁽⁶³⁾.

3.4.3.1 Quantificação do DNA

A quantidade e a pureza do DNA genômico foram verificadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies, EUA) nos comprimentos de ondas de 260nm (absorbância do DNA), 280nm (proteína) e 230nm (polissacarídeos). As razões 260/280 consideradas como ideais estão entre os valores 1,8-2,0 e para 260/230, valores acima de 1,9. Algumas amostras não atingiram os valores adequados⁽⁶⁴⁾.

As amostras tiveram a integridade do DNA verificadas por corrida de gel de agarose. Essa análise foi feita de forma aleatória ou, às vezes, direcionada quando havia dúvidas sobre a integridade do DNA.

3.4.3.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados por aquecimento, dissolvendo-se agarose (Thermo Fisher Scientific, EUA) em tampão TAE 1x (Tris-acetato 40mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) na concentração final de 1,5% e, adicionada solução de brometo de etídio a 0,5µg/mL para coloração do DNA. As amostras de DNA analisadas foram misturadas a 1µl de tampão de amostra para DNA 10x (*BlueJuice Gel Loading Buffer*). Foram utilizados os marcadores de peso molecular: *100pb DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem máxima e constante de 100 V em tampão TBE (tris-borato EDTA) (1x) (Figura 19)⁽⁶⁵⁾.

Figura 19. Imagem de um gel de agarose com corrida de eletroforese

3.4.3.3 Amplificação e quantificação do gene por qPCR

O kit comercial MyTRECKit[®] (GenePlus[®]) para qPCR, específico para TREC, foi utilizado para quantificação de segmentos de DNA sjTREC e o seu controle ocorre pelo gene endógeno β -Actina⁽⁶⁶⁾. O Kit MyTREC[®] veio pronto para uso e formulado com sua mistura contendo a DNA polimerase (Taqman[®]), estabilizadores e desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs). Nele são acrescentados os amplificadores, inicializadores, as sondas *forward* e *reverse* e a referência passiva ROX[®].

O kit também apresenta a curva-padrão já pré-estabelecida com o número de cópias para o gene-alvo TREC (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 25) e para a normatização dos resultados, também a curva-padrão para o gene constitutivo β -Actina (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2).

A reação de amplificação do DNA foi estabelecida com mix total de 16 μ L (10 μ L de *master mix*, 1 μ L de *primers* e sondas, 1 μ L do amplificador e 4 μ L água *nuclease-free*) mais 4 μ L da amostra do DNA ou seu controle negativo ou positivo. O programa de ciclagem foi estabelecido para o primeiro ciclo em 95°C durante 3 minutos (ativação da polimerase), seguido de 40 ciclos para amplificação do DNA, sendo que cada ciclo foi estabelecido em 95°C por 30 segundos (desnaturação), alternado com 60°C durante 1 minuto (amplificação).

O aparelho para o qPCR (Applied Biosystems QuantStudio™ 12K Flex) foi programado para atuar de acordo com a curva-padrão para quantificação absoluta. O *reporter* FAM™ foi aplicado no sjTREC, enquanto que o *reporter* para β -actina foi VIC™. NFQ-MGB foi aplicado como *quencher* para ambos os genes. As curvas-padrão ocorreram em triplicatas e as amostras e controles em duplicatas. As repetições foram realizadas em duplicatas ou triplicatas, conforme o caso.

A linha de base foi estabelecida no 3º ciclo e a linha do *threshold* foi fixada em 0,043745 para sjTREC e em 0,09886 para β -actina para todas as placas. Em todas as placas, o declive (*slope*) se apresentou entre -3,58 e -3,10, com eficácia de amplificação em torno de 94% e 100% e coeficiente de correlação (R^2) > 0,99 (Figuras 20a-e).

Figura 20a. Amplificação da curva-padrão para TREC

Figura 20b. Curva-padrão para TREC

Figura 20c. Amplificação da curva-padrão para β -Actina

Figura 20d. Curva-padrão para β -Actina

Figura 20e. Exemplo de amplificação dos DNAs sjTREC (alvo) e β -Actina (calibrador) na amostra de um paciente participante do estudo

O sjTREC foi expresso como número de cópias por μg de DNA após ter sido correlacionado com o gene endógeno β -actina. O *cut-off* estabelecido foi de ≤ 10 sjTREC cópias/ μg de DNA. A expressão do resultado em μg de DNA foi originada por cálculos (Figura 21).

Cálculo e forma de expressão dos resultados para sjTREC

Os resultados TREC estão expressos em n° de cópias/μg de DNA

Cada célula diplóide possui ± 6pg DNA genômico e 2 cópias de β-actina

Então, fórmula:

$$x = \frac{\text{n° de cópias b-Actina} \times 6,6 \text{ pg}}{2} \quad \text{ou} \quad x = \text{n° de cópias b-Actina} \times 3,3$$

resultado de "x" está resultado expresso em pg de DNA!

e para expressar o mesmo resultado em ng de DNA? Resposta: dividir por 1000

Então: x (n° de cópias b-Actina em pg)/1000 = y (n° de cópias b-Actina em ng)

n° de cópias de b-Actina equivale ao n° de cópias TREC contido em cada 1 ng de DNA

PERGUNTA: Quantas cópias TREC em relação n° de cópias b-Actina existem em 1000 ng ou 1 μg de DNA?

A relação entre TREC e b-Actina significa n° de cópias TREC/n° de cópias b-Actina, mas o resultado ainda está expresso em 1 ng de DNA, porém se multiplicarmos a relação por 1000, o resultado será expresso em 1000 ng ou seu equivalente em μg (no caso, 1 μg de DNA)

RESPOSTA FINAL: $z = \text{n° de cópias TREC (em relação ao n° de cópias b-Actina)}/1 \text{ μg de DNA}$

Ou " z " **cópias sjTREC/μg de DNA**

Figura 21. Cálculo utilizado para expressão do sjTREC na unidade μg de DNA

3.5 Avaliação clínica de DECH

Todos os centros de TCTH utilizam alguma classificação para definição de DECH-A e -C e, desta forma, determinar o grau de acometimento dessas doenças nos indivíduos transplantados.

A individualização da classificação é necessária para todos os pacientes porque a intensidade de DECH varia conforme uma série de fatores, dentre eles a idade, o tipo de infusão de CTH, o regime de condicionamento empregado, compatibilidade ABO e a profilaxia de imunossupressão, ou seja, o acometimento de DECH tem ampla variabilidade de apresentação clínica, seja com características de “aguda”, seja com características de “crônica”.

O paciente, às vezes, ainda poderá sofrer reclassificação da DECH com o passar do tempo, principalmente devido à resposta ao tratamento imunossupressivo que visa controlar o processo fisiopatológico ou devido ao acometimento de infecções secundárias que podem intensificar o processo de DECH.

A classificação de DECH-A, utilizada no centro de TCTH de Jaú, obedece à preconizada pela Conferência sobre TCTH realizada em 1994, que é a Escala Modificada de Glucksberg (anexo A, quadro 3)⁽⁶⁷⁾.

A classificação de DECH-C segue a preconizada pelas Conferências sobre TCTH e DECH-C realizadas em 2005 e em 2014 pelo NIH (National Institutes of Health) (anexos B1-3, quadros 4-6; anexos C1 e 2, quadros 7 e 8)^(68, 69).

3.6 Análise estatística

Foram descritas as idades segundo grupos com uso de média e desvio-padrão e comparada entre os grupos com uso de teste *t-Student* e o sexo foi descrito segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e verificada a associação com uso do teste qui-quadrado⁽⁶⁹⁾. Os diagnósticos dos pacientes foram descritos com uso de frequências absolutas e relativas.

Os níveis de linfócitos e cópias de sjTREC foram apresentados segundo grupos e posteriormente segundo grupos de diagnósticos e estratificados por faixas etárias em gráficos com os respectivos sumários das variáveis e comparados com uso de testes Mann-Whitney para comparações entre duas categorias apenas ou teste Kruskal-Wallis para mais de duas categorias seguido de comparações múltiplas de Dunn para identificar entre quais categorias ocorreram as diferenças⁽⁷⁰⁾.

O valor do sjTREC foi classificado como baixo e alto, usando como corte o valor da mediana dos indivíduos saudáveis e verificada a associação entre o sjTREC e as características avaliadas com uso de regressão logística bivariada. Foi estimado o modelo de regressão logística múltipla⁽⁷¹⁾ para avaliar a associação das características com o baixo valor de TREC independente das demais características avaliadas.

Foram estimadas as sobrevidas globais e livre de doença (DECH-C, recaída ou óbito) para pacientes que submetidos ao TCTH-alo ou –auto separadamente com uso de funções Kaplan-Meier segundo as características de interesse e comparados os desfechos segundo as categorias com uso de testes *log-rank* e estimados os *Hazard Ratios* (HR) não ajustados e ajustados com uso de regressão de Cox bivariada e múltipla respectivamente⁽⁷²⁾.

Para correlação entre variáveis contínuas (idade e sjTREC) foi utilizado o teste de Spearman. Foram criados os modelos de riscos competitivos para DECH-C segundo

as características de interesse com uso dos modelos de Fine e Gray⁽⁷³⁾ e estimadas as funções de incidência acumuladas bem como os testes de Fine e Gray das categorias de sjTREC para DECH-C, DECH-A, infecção bacteriana e infecção por CMV.

Os valores de sjTREC foram descritos segundo a ocorrência de DECH-C na evolução e segundo óbito para cada tipo de TCTH, bem como as citocinas e parâmetros da citometria de fluxo segundo ocorrência de DECH-C com uso de medidas resumo (média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparados ao longo dos momentos de avaliação e entre a ocorrência de DECH-C ou óbito para sjTREC com uso de equações de estimação generalizadas (EEG) com distribuição marginal gama e função de ligação identidade, supondo matriz de correlações autorregressivas de primeira ordem entre os momentos de avaliação⁽⁷⁴⁾.

Para comparação da ocorrência de infecção geral (bacteriana e/ou viral e/ou fúngica) ao longo do seguimento e ocorrência de DECH-C, foram usadas equações de estimação generalizadas com distribuição marginal binomial e função de ligação logito com matriz de correlações autorregressiva de primeira ordem entre os momentos de avaliação⁽⁷⁴⁾. Todas as análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni⁽⁷⁵⁾, quando significativas para identificar entre quais momentos ou segundo ocorrência de DECH-C ocorreram as diferenças nos parâmetros.

Para realização das análises, foram utilizados os *softwares* IBM-SPSS for Windows versão 20.0 e MedCalc versão 17.4 e, para tabulação dos dados, foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2010. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

A inclusão de pacientes submetidos ao TCTH ocorreu entre 13/03/2015 e 15/10/2016. Nesse período ocorreram 343 TCTH no Hospital Amaral Carvalho. A meta inicial era obter 100 pacientes, sendo 65 submetidos ao TCTH-alo e o restante ao TCTH-auto, mas conseguimos obter 118 pacientes com TCLE assinado (34,4%; 118/343), sendo 75 submetidos ao TCTH-alo (21,9%; 75/343) e 43 pacientes ao TCTH-auto (12,5%; 43/343).

Os motivos de exclusão dos pacientes foram: (1) idade fora do limite pré-estabelecido (26,5%: 62 pacientes <18 anos e 29 pacientes >60 anos; 91/343); (2) coleta amostral inadequada (volume ou intervalo de tempo) ou não coleta amostral (16,4%; 56/343), recusa em participar do estudo (7,2%; 25/343) ou mesmo não aplicação do TCLE (4,4%; 15/343); (3) pacientes que foram submetidos ao TCTH decorrente de outras patologias (11,1% pacientes com diagnóstico de aplasia de medula óssea, mielofibrose, leucemia mieloide crônica ou tumor de células germinativas; 38/343) que não as previamente estabelecidas, ou seja, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfóide aguda (LLA) ou síndrome mielodisplásica (SMD) para o TCTH-alo ou linfoma não Hodgkin (LNH), doença de Hodgkin (DH) ou mieloma múltiplo (MM) para o TCTH-auto (Figura 22).

Legendas: m: meses; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Figura 22. Fluxograma de inclusão de indivíduos e número de amostras para o estudo

Em paralelo, foram incluídos 54 indivíduos saudáveis, doadores de sangue, pareados na variação de idade com os pacientes (18 e 60 anos).

Entre os indivíduos saudáveis, a média de idade foi de 40 anos (IC 95%: 36–43 anos) (n= 54) e entre os pacientes, a média de idade foi de 41 anos (IC 95%: 39–43 anos) (n= 119) (p= 0,423).

A distribuição do sexo entre os pacientes (n= 118) e indivíduos saudáveis (n= 54) foi bastante semelhante, porém com leve predomínio do sexo masculino nos pacientes submetidos ao TCTH-alo em relação aos demais (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos indivíduos de acordo com o sexo (n total= 172)

Sexo	Total	Pacientes (TCTH-alo)	Pacientes (TCTH-auto)	Indivíduos saudáveis	p
Masculino	97 (56,4%)	41 (23,8%)	29 (16,9%)	27 (15,7%)	p= 0,254
Feminino	75 (43,6%)	34 (19,8%)	14 (8,1%)	27 (15,7%)	

Legenda: alo: alogênico; auto: autólogo; n: número de indivíduos; TCTH: transplante de células-tronco hematopoéticas

4.1 Situação pré-transplante

Na situação pré-TCTH, os pacientes (objeto do estudo) foram comparados com os indivíduos saudáveis (controle) em relação à quantificação de linfócitos/mm³ e de sjTREC cópias/μg de DNA.

Entre os 118 pacientes incluídos, em 111 havia a quantificação de linfócitos e de sjTREC. Houve a comparação entre 111 pacientes e 54 indivíduos saudáveis (n= 165).

Os indivíduos saudáveis apresentaram mediana de linfócitos e de sjTREC maior do que os pacientes (p< 0,001) (Figuras 23 e 24).

Figura 23. Comparação na quantificação de linfócitos entre pacientes e indivíduos saudáveis

Figura 24. Comparação na quantificação de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis

No entanto, a variação na quantificação de linfócitos foi maior e menos uniforme entre os pacientes, enquanto que em relação à variação na quantificação do sjTREC, foi curiosamente maior e menos uniforme entre os indivíduos saudáveis (Figuras 25 e 26) (Tabela 3).

Figura 25. Variação na quantificação de linfócitos, comparação entre pacientes e indivíduos saudáveis

Figura 26. Variação na quantificação de sjTREC, comparação entre pacientes e indivíduos saudáveis

Tabela 3. Distribuição dos linfócitos e de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis

** População	Mediana	(IC 95%)	Mínimo	Máximo
Pacientes (n= 111)				
linfócitos	378	305-494	44	3880
sjTREC	62	41 - 93	10	1843
Ind. saudáveis (n= 54)				
linfócitos	1898	1716-2077	493	3822
sjTREC	607	338-816	28	8837

Legenda: Ind.: indivíduos

**Diferença entre linfócitos: $p < 0,001$ e entre sjTRECs: $p < 0,001$

A variação de idade entre os dois grupos foi bastante semelhante ($p = 0,542$) (Figura 27). Entretanto, foi possível verificar que à medida que a idade avança, existe queda significativa na contagem de sjTREC entre os indivíduos saudáveis (coeficiente de Spearman: $-0,581$, $p < 0,001$) e não tão exacerbada entre os pacientes (coeficiente de Spearman: $-0,142$, $p = 0,138$) (Figura 28).

Figura 27. Variação da idade entre os pacientes e os indivíduos saudáveis

A população estudada ($n=165$) foi separada por grupos etários de forma arbitrária (Figura 29).

Figura 28. Diagrama de dispersão - relação negativa entre idade (eixo x) e sjTREC cópias (eixo y) nos dois grupos de indivíduos (pacientes e indivíduos saudáveis)

Figura 29. Distribuição da população estudada de acordo com faixas etárias

A mediana de sjTREC apresentou queda na contagem à medida que os subgrupos etários avançam na idade, tanto entre os pacientes como entre os indivíduos saudáveis. Notadamente, a quantificação de sjTREC foi significativamente maior entre os indivíduos saudáveis em todos os subgrupos etários ($p < 0,001$) (Figura 29) (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis de acordo com os grupos etários: 18-24 anos; 25-35 anos; 36-49 anos e 50-60 anos

Grupos etários	sjTREC cópias/ μ g DNA			
	Mediana	(IC 95%)	Mínimo	Máximo
18-24 anos				
Pacientes (n= 15)	99	48-271	10	988
Ind. saudáveis (n= 11)	1101	678-1671	131	8837
	$p < 0,001$			
25-35 anos				
Pacientes (n= 22)	58	13-168	10	1138
Ind. saudáveis (n= 12)	951	282-1431	180	2258
	$p < 0,001$			
36-49 anos				
Pacientes (n= 40)	59	36-154	10	1843
Ind. saudáveis (n= 14)	590	186-814	128	1996
	$p < 0,001$			
50-60 anos				
Pacientes (n= 34)	45	27-87	10	548
Ind. saudáveis (n= 17)	196	125-597	28	3016
	$p < 0,001$			

Legenda: Ind.: indivíduos

A quantificação do sjTREC de acordo com o sexo demonstrou que a mediana foi maior no sexo feminino em relação ao masculino para ambos os grupos, porém de forma significativa somente entre os pacientes ($p = 0,011$) e, independentemente do sexo, os indivíduos saudáveis apresentaram maior mediana de sjTREC do que os pacientes ($p < 0,001$) (Figura 30) (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis de acordo com o sexo

Grupos	sjTREC cópias/ μ g DNA			
	Mediana	(IC 95%)	Mínimo	Máximo
Pacientes				
Masculino (n= 65)	38	35-69	10	1843
Feminino (n= 46)	106	63-139	10	1230
	$p = 0,011$			
Indivíduos saudáveis				
Masculino (n= 27)	597	299-692	105	3016
Feminino (n= 27)	620	196-1030	28	8837
	$p = 0,828$

Figura 30. Quantificação de sjTREC de acordo o sexo da população (n=165)

Na comparação de sjTREC em relação à idade e separada pelo sexo, há um declínio gradual na quantificação em todos os grupos à medida que avança a idade (coeficientes de Spearman de indivíduos saudáveis: -0,756 – sexo feminino; -0,383 – sexo masculino; coeficientes de Spearman de pacientes: -0,069 – sexo feminino; -0,176 – sexo masculino). No entanto, o declínio é mais acentuado (significativo) entre os indivíduos saudáveis ($p < 0,001$ – sexo feminino e $p = 0,049$ – sexo masculino) do que entre os pacientes ($p = 0,650$ – sexo feminino e $p = 0,161$ – sexo masculino) (Figura 31).

De modo arbitrário, LMA e SMD foram agrupadas como doenças mieloides e LNH e DH como linfomas. Em relação à doença prévia que motivou a realização do TCTH, a LMA foi a doença mais prevalente e a SMD, de menor prevalência (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição da população em relação à doença prévia

Tipo de TCTH	Por grupamento	Doença prévia
		$p < 0,001$
Alogênico 75 (63,5%)	LLA 30 (25,4%)	LLA 30 (25,4%)
	Doenças mieloides 45 (38,1%)	LMA 41 (34,7%)
		SMD 4 (3,4%)
Autólogo 43 (36,5%)	MM 26 (22,1%)	MM 26 (22,1%)
	Linfomas 17 (14,4%)	LNH 10 (8,5%)
		DH 7 (5,9%)

Legenda: DH: doença de Hodgkin; LLA: leucemia linfocítica aguda; LMA: leucemia mielocítica aguda; LNH: linfoma não Hodgkin; MM: mieloma múltiplo; SMD: síndrome mielodisplásica

Legendas: F: sexo feminino; Ind. saud.: indivíduos saudáveis; M: sexo masculino

Figura 31. Diagrama de dispersão - relação entre idade (eixo x) e sjTREC cópias (eixo y) nos dois grupos de indivíduos (indivíduos saudáveis e pacientes), discriminados por sexo

Os pacientes, divididos por grupos de doenças, foram comparados com os indivíduos normais em relação à quantificação de sjTREC. Os indivíduos saudáveis apresentaram mediana de sjTREC maior do que qualquer grupo de pacientes ($p < 0,0001$) e o grupo de pacientes com doença mielóide apresentou mediana de sjTREC mais elevada do que os pacientes com MM ($p = 0,013$) (Figura 32) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição de sjTREC entre pacientes e indivíduos saudáveis de acordo com os grupos de doenças: doenças mielóides; LLA; linfomas e MM

Grupos por doenças	sjTREC cópias/ μ g DNA			
	Mediana	(IC 95%)	Mínimo	Máximo
D. mielóides (n= 42)	130	52-159	10	1843
Ind. saudáveis (n= 54)	607	338-816	28	8837
p < 0,001				
LLA (n= 30)	68	19-132	10	988
Ind. saudáveis (n= 54)	607	338-816	28	8837
p < 0,001				
Linfomas (n= 16)	62	21-110	10	730
Ind. saudáveis (n= 54)	607	338-816	28	8837
p < 0,001				
MM (n= 22)	31	22-49	10	548
Ind. saudáveis (n= 54)	607	338-816	28	8837
p < 0,001				
MM (n= 22)	31	22-49	10	548
D. mielóides (n= 42)	130	52-159	10	1843
p = 0,013				

Legenda: D.: doenças; Ind.: indivíduos

Figura 32. Quantificação de sjTREC de acordo o tipo de doença prévia ao TCTH (n= 165)

A média de idade por grupo de pacientes foi: 39 anos (IC 95%: 36–43) para indivíduos saudáveis, 52 anos (IC 95%: 49–54) para MM, 45 anos (IC 95%: 38–52) para linfomas, 39 anos (IC 95%: 36–42) para doenças mieloides e 33 anos (IC 95%: 29–37) para LLA. Entre os indivíduos saudáveis e os grupos de doenças, existe diferença de média de idades em relação à LLA e ao MM (respectivamente, $p=0,022$ e $p<0,001$). Particularmente entre os pacientes com doença mieloide, também foi observada semelhante diferença de idades em relação à LLA e ao MM ($p<0,001$).

A mediana de sjTREC encontrada na população foi de 607 sjTREC cópias/ μ g DNA. De forma arbitrária, nós estabelecemos que os valores sjTREC obtidos ≥ 607 cópias fossem denominados “altos valores” e aqueles encontrados abaixo da mediana, fossem denominados “baixos valores”. Então estabelecemos três prováveis fatores de risco associados ao “valor baixo” de sjTREC: sexo, idade e a própria população (história de tratamento para neoplasia hematológica maligna [paciente] versus ausência de história [indivíduo saudável]).

Por meio das análises univariada e multivariada de regressão logística, o fator “envelhecer” (idade) e o fator “ter sido tratado para doença hematológica maligna” (paciente) são dois fatores de risco independentes para o desenvolvimento de “valor baixo” de sjTREC ou função tímica deteriorada. O paciente tem uma razão de chances 12,88 vezes mais do que o indivíduo saudável para o desenvolvimento de sjTREC em “baixo valor” ($p<0,001$), enquanto que indivíduos ≥ 50 anos têm razão de chances 10,07 mais do que indivíduos ≤ 24 anos para o desenvolvimento de “baixo valor” de sjTREC ($p<0,001$). Ambas as situações foram confirmadas como fatores de risco independentes na análise multivariada (paciente [OR= 17,25] $p<0,001$; idade ≥ 50 anos [OR= 17,35] $p<0,001$) (Tabela 8).

Tabela 8. Análise univariada e multivariada por regressão logística em relação à razão de chances (OR) para “valores baixos” de sjTREC

Valor de sjTREC										
Variável	Alto (n= 35)	Baixo (n= 130)	OR não ajustado	IC 95%		p	OR ajustado	IC 95%		p
				Baixo	Alto			Baixo	Alto	
Sexo										
Feminino	18 (24,7)	55 (75,3)	1,00				1,00			
Masculino	17 (18,5)	75 (81,5)	1,44	0,68	3,05	0,336	1,27	0,50	3,25	0,619
Idade										
18 - 24	12 (46,2)	14 (53,8)	1,00				1,00			
25 - 35	7 (20,6)	27 (79,4)	3,31	1,06	10,27	0,039	4,67	1,13	19,27	0,033
36 - 49	12 (22,2)	42 (77,8)	3,00	1,10	8,18	0,032	2,84	0,80	10,03	0,105
50 - 60	4 (7,8)	47 (92,2)	10,07	2,80	36,20	< 0,001	17,35	3,75	80,21	< 0,001
População										
Saudável	27 (50)	27 (50)	1,00				1,00			
Paciente	8 (7,2)	103 (92,8)	12,88	5,26	31,53	< 0,001	17,25	6,28	47,38	< 0,001

Legenda: OR (do inglês *odds ratio* ou razão de chances)

A quantificação de sjTREC também foi comparada entre todos os pacientes e os indivíduos saudáveis mais velhos (≥ 50 anos de idade). Foi possível observar que o grupo de pacientes, independentemente da idade (18-60 anos), também apresentou mediana de sjTREC inferior inclusive ao subgrupo de indivíduos saudáveis mais velhos ($p < 0,001$) (Figura 33) (Tabela 9).

Figura 33. Quantificação de sjTREC pacientes de todas as idades e indivíduos saudáveis mais velhos (≥ 50 anos)

Tabela 9. Comparação de sjTREC entre pacientes de todas as idades e indivíduos saudáveis mais velhos (≥ 50 anos)

Grupos	sjTREC cópias/ μ g DNA			
	Mediana	(IC 95%)	Mínimo	Máximo
Pacientes (n= 111)	62	41-93	10	1843
Ind. saudáveis (n= 17)	196	125-597	28	3016
p < 0,001				

Legenda: Ind.: indivíduos

Por fim, vários fatores são obrigatoriamente considerados em todos os centros de TCTH antes da realização do procedimento. Alguns deles são, inclusive, passíveis de influência direta no seguimento do paciente após o TCTH. No presente estudo, nós incluímos a avaliação de sjTREC estratificada em valores baixos e altos nesta descrição de dados observáveis para a realização do TCTH-alo (Tabela 10).

Tabela 10. Características dos pacientes submetidos ao TCTH-alo (n= 75)

	TCTH-alo		p= (valor)
idade	<50 anos	≥50 anos	0,028
	47 (62,7%)	28 (37,3%)	
sexo (doador F para receptor M)	presente	ausente	< 0,001
	16 (21,3%)	59 (78,7%)	
incompatibilidade ABO (Ma, me, Ma/me)	presente	ausente	0,004
	25 (33,3%)	50 (66,7%)	
CMV (doador/receptor)	positivo/negativo ou negativo/positivo	negativo/negativo ou positivo/positivo	< 0,001
	13 (17,3%)	62 (82,7%)	
HLA (idêntico)	aparentado (8x8)	não aparentado (10x10)	< 0,001
	59 (78,7%)	16 (21,3%)	
função tímica	baixo valor	alto valor	< 0,001
	61 (81,3%)	14 (18,7%)	
fonte de células-tronco	medula óssea	periferia (aférese)	0,298
	42 (56%)	33 (44%)	
células CD 34 ⁺ /kg x 10 ⁶	≥8	<8	< 0,001
	12 (16%)	63 (84%)	
células nucleadas/Kg x 10 ⁸	≥2	<2	< 0,001
	37 (88,1%)	5 (11,9%)	
regime de condicionamento*	RIC - NMA	MAC	0,004
	25 (33,3%)	50 (66,7%)	
profilaxia para DECH	CSA + MTX	CSA + outras	< 0,001
	61 (81,3%)	14 (18,7%)	

Legenda: alo: alogênico; CMV: citomegalovírus; CSA: ciclosporina; DECH: doença do Enxerto-versus-Hospedeiro; F: feminino; HLA: antígeno leucocitário humano; M: masculino; MAC: regime de condicionamento mieloablativo; Ma: maior; me: menor; MTX: metotrexate; NMA: regime de condicionamento não-mieloablativo; RIC: regime de condicionamento com intensidade reduzida; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

* Na presente casuística não houve pacientes submetidos ao regime NMA; maiores informações no anexo E

4.2 Situação pós-transplante

A avaliação pós-TCTH foi direcionada, de modo geral, basicamente e quase exclusivamente para eventos de DECH-C e infecções.

Após um ano de TCTH, foi observado que a mediana de DECH-A ocorreu com 20 dias e apresentou variação entre mínimo e máximo de 10 e 56 dias, respectivamente. Por outro lado, a DECH-C apresentou mediana de 174 dias e variação entre mínimo e máximo de 67 a 287 dias. A incidência de DECH-A (graus I-IV) foi de 54,7% (41/75) e a de DECH-C foi de 49,3% (37/75).

4.2.1 Fatores de risco para DECH-C

Alguns fatores foram considerados para avaliar suas influências para o risco de desenvolver DECH-C na população TCTH-alo estudada. Entre os dados considerados, somente o sjTREC baixo valor se apresentou como um fator de risco presente, porém devido ao baixo “n” para valor alto não foi possível estimar a sua influência sobre o DECH-C (Tabela 11).

Tabela 11. Risco competitivo para DECH-C de acordo com fatores pré-determinados

Desfecho	Variável	HR _{não ajustado}	IC (95%)		p	HR _{ajustado}	IC (95%)		p
			Inferior	Superior			Inferior	Superior	
DECH-C	Faixa etária (≥50 anos)	1,42	0,61	3,34	0,420	1,01	0,37	2,78	0,990
	Doador Fem Receptor Masc	1,59	0,78	3,23	0,200	1,96	0,85	4,50	0,110
	Compatibilidade ABO (Incompatível)	1,19	0,61	2,34	0,610				
	Compatibilidade ABO (Maior)	1,11	0,50	2,45	0,800	1,15	0,47	2,81	0,760
	CMV paciente/doador (diferentes)	0,48	0,17	1,32	0,150				
	Pac. CMV+ Doador CMV-	0,19	0,02	1,53	0,120	0,17	0,02	1,73	0,140
	Doador (Não aparentado)	0,48	0,19	1,22	0,120	0,33	0,12	0,92	0,033
	MAC	0,80	0,41	1,59	0,530	1,20	0,40	3,59	0,740
	Profilaxia DECH (Outras)*	1,19	0,49	2,90	0,700	1,44	0,40	5,24	0,580
	Fonte cel (MO)	0,80	0,42	1,51	0,490	0,51	0,23	1,16	0,110
	Enxertia (Tardia)	0,71	0,37	1,33	0,280	0,84	0,37	1,91	0,680
	DECH-A	0,99	0,52	1,87	0,960	1,00	0,45	2,24	0,990
	DECH-A (Graus 3 ou 4)	0,70	0,21	2,34	0,560				
	sjTREC baixo	#			0,019				

Regressão de risco competitivo; Teste de Fine e Gray. * profilaxia DECH (outras): micofenolato mofetil (MMF) ou corticoide. # HR sem estimativa pelo baixo número de sjTREC com valores altos

Legendas: cel.: celular; DECH-A: doença do enxerto-contrá-hospedeiro aguda; DECH-C: doença do enxerto-contrá-hospedeiro crônica; HR: do inglês, hazard ratio ou risco relativo; Fem: feminino; Masc: masculino; CVM: citomegalovírus; HLA: antígeno leucocitário humano; MAC: regime de condicionamento mieloablativo; MO: medula óssea

Especificamente sobre a enxertia medular de neutrófilos na presente casuística, ela foi considerada como um dos possíveis fatores de risco para DECH-C, porém não apresentou significância estatística ($p=0,680$). No Hospital Amaral Carvalho a enxertia de neutrófilos é considerada quando atinge por três dias seguidos a contagem ≥ 500 neutrófilos/mm³.

No presente trabalho, a enxertia apresentou mediana de 16 dias para o TCTH-alo, com variação entre sete e 35 dias, enquanto que nos pacientes TCTH-auto, a mediana foi 11 dias, com variação entre mínimo e máximo de nove a 17 dias ($p < 0,001$). A mediana de enxertia decorrente da MO como fonte de células ocorreu aos 17 dias com mínimo de 11 e máximo de 35 dias, enquanto que a mediana de enxertia decorrente de CPT ocorreu com 12 dias e apresentou mínimo e máximo de sete e 32 dias, respectivamente ($n = 118$).

A mediana da enxertia envolvendo todos os pacientes foi de 14 dias. Foi denominada enxertia precoce quando a enxertia ocorreu abaixo da mediana de 14 dias e enxertia tardia quando ≥ 14 dias. Não houve relação entre tempo de enxertia medular e recuperação da função tímica. O sjTREC não apresentou diferença estatisticamente significativa segundo o TCTH e tempo de enxertia (p grupo = 0,688), houve apenas recuperação da função tímica (aumento de sjTREC) com o passar do tempo em todos os quatro grupos analisados (p momento = 0,007) (Tabela 12).

Como o sjTREC se apresentou como único fator de risco para DECH-C, a incidência cumulativa para eventos de infecção (bacteriana e viral) e de DECH (-A e -C) foi avaliada associada a esse fator (Figuras 34 a-d).

Tabela 12. Relação entre tempo de enxertia por tipo de TCTH e evolução de sjTREC

Variável/Momento	Grupo				p	p	p
	TCTH-auto enxertia precoce	TCTH-auto enxertia tardia	TCTH-alo enxertia precoce	TCTH-alo enxertia tardia	Grupo	Momento	Interação
sjTREC					0,688	0,007	0,829
3 meses	(N = 37)	(N = 3)	(N = 17)	(N = 44)			
média±DP	101,5 ± 204,4	155,5 ± 159,1	151,2 ± 220,5	151,1 ± 210,8			
mediana (mín.; máx.)	47,3 (10; 1204,5)	119,7 (17,3; 329,4)	81,5 (10; 770,4)	86,1 (10; 958,9)			
6 meses	(N = 32)	(N = 2)	(N = 13)	(N = 39)			
média±DP	152,1 ± 204,4	127,7 ± 49	168,1 ± 206,5	191,5 ± 252,5			
mediana (mín.; máx.)	90 (10; 1023,7)	127,7 (93; 162,3)	80,9 (18,1; 770,4)	117,6 (10; 1220,5)			
9 meses	(N = 30)	(N = 3)	(N = 15)	(N = 38)			
média±DP	327,2 ± 605,6	184,1 ± 133,9	360,5 ± 327,1	451,3 ± 619,4			
mediana (mín.; máx.)	123,9 (10; 2595,3)	137,8 (79,5; 335,1)	221,7 (50,2; 1111,7)	258,7 (10; 2665,6)			
12 meses	(N = 28)	(N = 3)	(N = 15)	(N = 30)			
média±DP	408,2 ± 599,6	675 ± 527,2	749,2 ± 1001,7	437,9 ± 626,7			
mediana (mín.; máx.)	189,7 (10; 2363,2)	375,7 (365,6; 1283,7)	362,9 (10; 3853,2)	237,8 (21,4; 3282,4)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Figuras 34 a-d. Incidência cumulativa de eventos de infecção e de DECH, de acordo com sjTREC

Os gráficos de incidência cumulativa apontaram relação entre sjTREC baixo e eventos futuros de DECH. Na presente casuística, a relação foi oposta entre DECH-A ($p= 0,004$) e DECH-C ($p= 0,019$). No gráfico 34c o valor alto de sjTREC esteve associado com incidência cumulativa aumentada para eventos de DECH-A (graus III-IV), enquanto que no gráfico 34d, foi observado que o valor baixo de sjTREC é que se associou à incidência cumulativa aumentada para eventos de DECH-C.

4.2.2 Sobrevida global e sobrevida livre de eventos

A estimativa de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE) (DECH-C, óbito ou recaída) em cada tipo de TCTH (-auto e -alo) foi avaliada.

Não houve influência na SG e SLE (óbito ou recaída da doença) nos pacientes submetidos ao TCTH-auto entre as variáveis consideradas para o presente estudo, isto é, idade, sexo, surgimento de infecção bacteriana ou por CMV, tempo de enxertia de neutrófilos e função tímica (sjTREC valor alto versus baixo) ($p> 0,05$) (Tabelas 13 e 14).

Em relação ao TCTH-alo, as variáveis: faixa etária ($<ou \geq 50$ anos), sexo, tipagem HLA de doador aparentado *versus* não aparentado, regime de condicionamento, fonte de células (medula óssea – MO ou coleta periférica – CTP), tempo de enxertia (acima ou abaixo da mediana de 14 dias), presença de DECH e função tímica foram consideradas para a SG e acrescidas das variáveis compatibilidades ABO, quantidade de células CD34⁺ infundidas ($<ou \geq 8 \times 10^6/Kg$), infecção por CMV e profilaxia para DECH para análise da SLE.

Houve redução de risco para óbito de 65% nos pacientes submetidos ao regime de condicionamento em mieloablação (Tabela 15).

Na análise de SLE, a profilaxia para DECH com o emprego da associação dos imunossupressores ciclosporina (CSA) e micofenolato mofetil (MMF) ou CSA e corticóide apresentou, em relação à associação CSA e metotrexato, risco aumentado para o surgimento de DECH-C, óbito ou recaída ($RR= 2,36$; $p= 0,007$). No entanto, após o ajuste da análise, nenhuma das características estudadas realmente apresentou influência sobre a SLE para o TCTH-alo ($p> 0,05$) (Tabela 16).

Tabela 13. Sobrevida global em pacientes submetidos ao TCTH-auto

Variável	Tempo médio estimado	IC (95%)		Óbitos	Total N	%	HR não ajustado	IC (95%)		p	HR ajustado	IC (95%)		p
		SE	Inferior					Superior	Inferior			Superior	Inferior	
Faixa etária											0,770			
Menos de 50 anos	830,35	66,11	700,77	959,92	2	15	13,3	1,00			1,00			
50 anos ou mais	846,25	46,45	755,22	937,29	4	28	14,3	1,25	0,23	6,94	0,40	0,03	5,63	0,493
Sexo Paciente											0,415			
Feminino	810,93	49,21	714,47	907,39	1	14	7,1	1,00			1,00			
Masculino	819,33	52,01	717,40	921,26	5	29	17,2	2,33	0,27	20,00	1,86	0,19	18,69	0,598
Infecção Bacteriana < 90 dias											0,192			
Não	872,88	37,59	799,20	946,55	2	24	8,3	1,00			1,00			
Sim	766,03	79,47	610,26	921,80	4	19	21,1	2,83	0,52	15,48	9,51	0,59	152,16	0,111
CMV < 90 dias											#			
Não	840,48	40,42	761,26	919,71	6	43	14,0							
Enxertia (Neutrofilos)											0,643			
Precoce	852,08	39,90	773,87	930,29	5	39	12,8	1,00			1,00			
Tardia	769,00	97,16	578,56	959,44	1	4	25,0	1,66	0,19	14,33	0,43	0,02	10,63	0,606
sjTREC											0,668			
Alto	853,00	0,00	853,00	853,00	0	1	0,0	1,00			1,00			
Baixo	825,90	42,89	741,83	909,96	5	38	13,2	#			#	0,992		
Total	840,48	40,42	761,26	919,71	6	43	14,0							

Teste log-rank nas análises não ajustadas; Regressão de Cox bivaridada e múltipla; # Não foi possível estimar devido ao baixo n em valores altos
Legendas: auto: autólogo; CMV: citomegalovírus; HR: do inglês, *harzard ratio* ou risco relativo; SE: do inglês, standard error ou desvio padrão

Tabela 14. Sobrevida livre de eventos (óbito ou recaída) em pacientes submetidos ao TCTH-auto

Variável	Tempo médio estimado	IC (95%)			Óbitos	Total N	%	HR não ajustado	IC (95%)		p	HR ajustado	IC (95%)		p	
		SE	Inferior	Superior					Inferior	Superior			Inferior	Superior		
Faixa etária											0,874					
Menos de 50 anos	694,60	88,36	521,41	867,79	5	15	33,3	1,00				1,00				
50 anos ou mais	713,95	69,32	578,08	849,81	8	28	28,6	0,90	0,29	2,77		0,72	0,18	2,89	0,647	
Sexo Paciente											0,161					
Feminino	752,29	71,83	611,49	893,08	2	14	14,3	1,00				1,00				
Masculino	672,60	65,97	543,30	801,91	11	29	37,9	2,78	0,62	12,56		2,96	0,64	13,81	0,166	
Infecção Bacteriana < 90 dias											0,929					
Não	715,82	62,84	592,65	839,00	8	24	33,3	1,00				1,00				
Sim	726,47	84,75	560,37	892,58	5	19	26,3	0,93	0,31	2,86		1,23	0,31	4,80	0,769	
CMV < 90 dias											#					
Não	721,25	52,87	617,63	824,88	13	43	30,2									
Enxertia (Neutrofilos)											0,837					
Precoce	718,22	55,49	609,45	826,98	12	39	30,8	1,00				1,00				
Tardia	691,25	170,39	357,29	1025,22	1	4	25,0	0,81	0,10	6,24		0,45	0,05	4,16	0,478	
sjTREC											0,502					
Alto	853,00	0,00	853,00	853,00	0	1	0,0	1,00				1,00				
Baixo	699,19	55,44	590,53	807,85	12	38	31,6	#				#			0,991	
Total	721,25	52,87	617,63	824,88	13	43	30,2									

Teste log-rank nas análises não ajustadas; Regressão de Cox bivaridada e múltipla; # Não foi possível estimar devido ao baixo número de casos

Legendas: auto: autólogo; CMV: citomegalovírus; HR: do inglês, *harzard ratio* ou risco relativo; SE: do inglês, standard error ou desvio padrão

Tabela 15. Sobrevida global em pacientes submetidos ao TCTH-alo

Variável	Tempo médio estimado	IC (95%)			Óbitos	Total N	%	HR não ajustado	IC (95%)		p	HR ajustado	IC (95%)		p
		SE	Inferior	Superior					Inferior	Superior			Inferior	Superior	
											0,811				
Faixa etária															
Menos de 50 anos	666,22	44,10	579,79	752,65	21	65	32,3	1,00				1,00			
50 anos ou mais	666,10	82,84	503,73	828,47	3	10	30,0	0,86	0,26	2,90		0,56	0,13	2,41	0,433
											0,552				
Sexo Paciente															
Feminino	624,75	58,05	510,98	738,52	12	34	35,3	1,00				1,00			
Masculino	692,88	52,91	589,17	796,59	12	41	29,3	0,79	0,35	1,75		0,80	0,33	1,97	0,632
											0,461				
Doador															
Aparentado	689,32	43,79	603,49	775,15	18	59	30,5	1,00				1,00			
Não aparentado	613,27	95,98	425,14	801,39	6	16	37,5	1,41	0,56	3,56		1,72	0,53	5,55	0,366
											0,344				
MAC															
Não	621,84	77,13	470,67	773,01	9	25	36,0	1,00				1,00			
Sim	702,95	45,26	614,24	791,66	15	50	30,0	0,67	0,29	1,54		0,35	0,12	0,99	0,047
											0,437				
Fonte de Células															
CTP	634,19	63,68	509,38	759,01	12	33	36,4	1,00				1,00			
MO	702,94	51,21	602,57	803,31	12	42	28,6	0,73	0,33	1,62		0,57	0,22	1,49	0,251
											0,114				
Enxertia (Neutrofilos)															
Precoce	783,16	66,73	652,37	913,95	3	19	15,8	1,00				1,00			
Tardia	636,65	47,69	543,18	730,13	21	56	37,5	2,57	0,77	8,60		4,11	1,10	15,34	0,036
											0,155				
DECH															
Sem DECH	651,22	86,81	481,07	821,38	6	17	35,3	1,00				1,00			
DECH-A	535,29	86,42	365,91	704,67	10	21	47,6	1,58	0,57	4,34		2,22	0,65	7,56	0,204
DECH-C	756,91	54,82	649,46	864,36	3	17	17,6	0,44	0,11	1,75		0,69	0,14	3,28	0,637
DECH-A+C	710,30	62,32	588,16	832,44	5	20	25,0	0,68	0,21	2,24		0,93	0,22	3,83	0,916
											0,474				
sjTREC															
Alto	559,86	139,52	286,40	833,32	3	7	42,9	1,00				1,00			
Baixo	684,08	42,50	600,78	767,37	20	65	30,8	0,64	0,19	2,17		1,30	0,32	5,33	0,714
Total	673,39	40,25	594,50	752,28	24	75	32,0								

Teste log-rank nas análises não ajustadas; Regressão de Cox bivaridada e múltipla

Legendas: auto: autólogo; CMV: citomegalovírus; CTP: célula tronco-periférica; DECH: doença do enxerto-contra-hospedeiro; HLA: antígeno leucocitário humano; HR: do inglês, *harzard ratio* ou risco relativo; MAC: regime de mieloablação; MO: medula óssea; SE: do inglês, standard error ou desvio padrão

Tabela 16. Sobrevida livre de eventos (DECH-C, óbitos ou recaídas) em pacientes submetidos ao TCTH-alo

Variável	Tempo médio estimado	IC (95%)			Óbitos	Total N	%	HR não ajustado	IC (95%)		p	HR ajustado	IC (95%)		p
		SE	Inferior	Superior					Inferior	Superior			Inferior	Superior	
Faixa etária											0,681				
Menos de 50 anos	209,00	21,88	166,11	251,89	46	65	70,8	1,00				1,00			
50 anos ou mais	196,00	11,86	172,76	219,24	8	10	80,0	1,17	0,55	2,50		0,95	0,36	2,53	0,918
Sexo Paciente											0,731				
Feminino	217,00	50,29	118,43	315,57	24	34	70,6	1,00				1,00			
Masculino	203,00	17,92	167,87	238,13	30	41	73,2	1,10	0,64	1,88		0,94	0,51	1,72	0,834
MAC											0,076				
Não	149,00	32,47	85,35	212,65	20	25	80,0	1,00				1,00			
Sim	215,00	21,21	173,42	256,58	34	50	68,0	0,61	0,35	1,06		0,73	0,26	2,05	0,552
Fonte de Células											0,279				
CTP	196,00	16,75	163,18	228,83	26	33	78,8	1,00				1,00			
MO	215,00	34,02	148,31	281,69	28	42	66,7	0,74	0,44	1,27		0,68	0,35	1,31	0,245
Doador											0,293				
Aparentado	206,00	13,71	179,12	232,88	45	59	76,3	1,00				1,00			
Não aparentado	207,00	98,00	14,92	399,08	9	16	56,3	0,68	0,33	1,40		0,80	0,30	2,11	0,645
Compatibilidade ABO											0,266				
Compatível ou menor	215,00	21,94	171,99	258,01	42	59	71,2	1,00				1,00			
Maior	171,00	42,00	88,68	253,32	12	16	75,0	1,44	0,76	2,74		1,43	0,67	3,07	0,357
CD34											0,674				
< 8	188,00	18,31	152,11	223,89	16	21	76,2	1,00							
> 8	203,00	81,41	43,44	362,56	10	12	83,3	1,19	0,54	2,62					
CMV < 90 dias											0,884				
Não	215,00	4,24	206,68	223,32	13	18	72,2	1,00				1,00			
Sim	203,00	13,68	176,18	229,82	41	57	71,9	1,05	0,56	1,96		0,78	0,36	1,71	0,540
Enxertia (Neutrofilos)											0,974				
Precoce	213,00	32,65	149,01	276,99	15	19	78,9	1,00				1,00			
Tardia	202,00	16,57	169,52	234,48	39	56	69,6	0,99	0,55	1,80		1,89	0,84	4,24	0,124
DECH-A											0,423				
Não	209,00	8,02	193,29	224,71	23	34	67,6	1,00				1,00			
Sim	202,00	23,04	156,83	247,17	31	41	75,6	1,25	0,73	2,14		1,49	0,78	2,81	0,225
Profilaxia DECH											0,007				
CSA+MTX	215,00	18,06	179,61	250,40	42	61	68,9	1,00				1,00			
CSA+outra*	102,00	15,90	70,83	133,17	12	14	85,7	2,36	1,24	4,52		2,79	0,91	8,49	0,072
sjTREC											0,350				
Alto	638,00	245,45	156,93	1119,07	4	7	57,1	1,00				1,00			
Baixo	203,00	17,27	169,14	236,86	47	65	72,3	1,62	0,58	4,52		2,16	0,65	7,13	0,209
Total	207,00	12,98	181,56	232,44	54	75	72,0								

Teste log-rank nas análises não ajustadas; Regressão de Cox bivaridada e múltipla * Outra: micofenolato mofetil ou corticoide. Legendas: auto: autólogo; CMV: citomegalovírus; CSA: ciclosporina; CTP: célula tronco-periférica; DECH: doença do enxerto-contra-hospedeiro; HLA: antígeno leucocitário humano; HR: do inglês, *hazard ratio* ou risco relativo; MAC: regime de mioablação; MO: medula óssea; MTX: metotrexato; SE: do inglês, standard error ou desvio padrão

Ainda, na estimativa de SG, os pacientes foram avaliados de acordo com a faixa etária (<50 anos versus ≥ 50 anos de idade) (Gráfico 1, Figura 35a), sexo (Gráfico 2, Figura 35b), fonte de células CD34⁺ (MO versus CTP) (Gráfico 3, Figura 35c), regime de condicionamento (mieloablação - MAC versus regime não mieloablativo - NMA mais regime de intensidade reduzida - RIC) (Gráfico 4, Figura 35d), tipo de TCTH (Gráfico 5, Figura 35e), tempo de enxertia dos neutrófilos considerando mediana de 14 dias (Gráfico 6, Figura 35f), função tímica (Gráfico 7, Figura 35g), e presença de DECH (Gráfico 8, Figura 35h).

Em relação ao TCTH-auto, o grupo de pacientes que foi submetido ao TCTH-auto apresentou melhor SG do que os pacientes submetido ao TCTH-alo aparentado ($p=0,047$) ou não aparentado ($p=0,024$) com *log-rank* pareado, porém na avaliação entre todas as curvas, não houve diferença na SG ($p=0,060$) (Figura 35e).

O grupo de pacientes submetido ao TCTH-auto, em relação à quantificação de sjTREC, apresentou melhor taxa de SG em relação ao TCTH-alo com sjTREC em valor baixo, seja TCTH-auto com sjTREC com valor alto ($p=0,042$) ou valor baixo ($p=0,047$) ao ser considerado *log-ranks* pareados, porém ao ser considerado o *log-rank* conjunto também não apresentou diferença significativa ($p=0,135$) (Figura 35g).

Exceto em duas situações, houve realmente diferença na SG entre os grupos: tempo de enxertia e regime de condicionamento. Houve melhor taxa de SG entre os pacientes submetidos ao regime de condicionamento para o TCTH-auto ($p=0,047$). No pareamento entre *log-ranks*, a diferença foi evidenciada entre o regime de condicionamento para o TCTH-auto e o regime de condicionamento RIC ($p=0,017$) (Figura 35d).

Houve melhor SG entre os pacientes submetidos ao TCTH-auto que apresentaram menor tempo de enxertia (≤ 14 dias) ($p=0,038$) e considerando *log-ranks* pareados, a diferença ocorreu entre o TCTH-auto com enxertia precoce em relação ao TCTH-alo com enxertia tardia ($p=0,009$) (Figura 35f).

Na estimativa de sobrevida global em relação ao DECH nos pacientes submetidos ao TCTH-alo, houve diferença entre paciente que apresentou DECH-A em relação ao que apresentou DECH-C no *log-rank* pareado ($p=0,038$), porém na análise grupal entre as curvas, essa diferença desapareceu ($p=0,155$) (Figura 35h).

Figuras 35a-h: Sobrevida Global para idade, sexo, fonte de células, condicionamento, TCTH, enxertia, função tímica e DECH

4.2.3 Regime de condicionamento, tipo de TCTH e recuperação da função tímica

Na comparação entre os três grupos (TCTH-auto versus TCTH-alo que apresentou eventos de DECH-C e TCTH-alo que não apresentou eventos de DECH-C), o comportamento de sjTREC foi semelhante, ou seja, houve queda significativa da função tímica após o regime de condicionamento, com melhora gradual com o passar do tempo (Tabela 17).

Tabela 17. Evolução de sjTREC ao longo do primeiro ano do TCTH

Variável/Momento	Grupo		
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C
sjTREC			
3 meses	(n= 40)	(n= 58)	(n= 3)
média±DP	105,5±200,2	155,5±216,1	66,6±49,4
mediana (mín.; máx.)	48,4 (10; 1204,5)	82,3 (10; 958,9)	89,1 (10; 100,8)
6 meses	(n= 34)	(n= 22)	(n= 30)
média±DP	150,7±198,4	144,3±251,6	216±230,7
mediana (mín.; máx.)	93,1 (10; 1023,7)	75,1 (10; 1220,5)	122,9 (10; 866,2)
9 meses	(n= 33)	(n= 21)	(n= 32)
média±DP	314,2±579	540,8±602	350±510,3
mediana (mín.; máx.)	137,1 (10; 2595,3)	309,3 (10; 2143,1)	155,2 (10; 2665,6)
12 meses	(n= 31)	(n= 20)	(n= 25)
média±DP	434±590,3	684,8±734,1	427,2±801,8
mediana (mín.; máx.)	227,3 (10; 2363,2)	477,9 (26,8; 3282,4)	147,2 (10; 3853,2)

Legenda: alo: alogênico; auto: autólogo; DECH: doença do Enxerto-contra-Hospedeiro; DP: desvio-padrão; mín: mínimo; max: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Teste estatístico: EEG com distribuição gama e função de ligação de identidade

p grupo= 0,356
p momento= <0,001
 p interação= 0,483

Curiosamente, quando observado de forma isolada, aparentemente o grupo de pacientes submetidos ao TCTH-alo que desenvolveram DECH-C apresentaram recuperação tímica mais precoce do que os demais grupos (seis meses versus nove meses, respectivamente), porém ao ser considerada a mediana dos três grupos ao longo dos quatro tempos determinados não houve diferença significativa (p de interação = 0,483). Provavelmente o número de casos de pacientes com DECH-C aos três meses tenha impedido que essa diferença se tornasse evidente ($n=3$ casos; $p=0,616$).

Por outro lado, o grupo submetido ao TCTH-alo que não desenvolveu DECH-C foi o que apresentou melhor índice de recuperação da função tímica ao final do primeiro ano, a tal ponto de apresentar mediana de sjTREC semelhante aos indivíduos saudáveis ($p=0,595$), algo que não ocorreu aos outros dois grupos (TCTH-alo com DECH-C, $p<0,001$; TCTH-auto, $p=0,003$). Na comparação com a mediana de todos os pacientes antes da realização do TCTH, todos os pacientes submetidos ao TCTH apresentaram significativa melhora da função tímica ao final de 12 meses (TCTH-alo sem DECH-C, $p<0,001$; TCTH-alo com DECH-C; $p=0,024$ e TCTH-auto, $p<0,001$).

A recuperação da função tímica dos pacientes submetidos ao TCTH-alo que não apresentaram DECH-C inclusive promoveu um distanciamento da mediana de sjTREC em relação aos demais grupos (TCTH-alo com DECH-C, $p=0,005$; TCTH-auto, $p=0,029$) (Figura 36).

Entre os 101 pacientes submetidos ao TCTH que tinham quantificação de sjTREC ao fim do primeiro ano, 33 pacientes apresentaram eventos de DECH-C e tinham média de idade de 38 anos (IC 95%: 35-42 anos), os que não apresentaram DECH-C tinham média de 35 anos (IC 95%: 30-39 anos) e os pacientes submetidos ao TCTH-auto, 49 anos (IC 95%: 46-52 anos).

Figura 36. Recuperação da função tímica - comparação entre a situação antes do TCTH e o fim do primeiro ano

4.2.4 Infecções, enxertia medular e função tímica

A incidência de infecções em geral (bacteriana e/ou viral e/ou fúngica) diminuiu conforme o passar do tempo. A incidência foi maior entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo. Os pacientes que desenvolveram DECH-C apresentaram maior incidência de infecções a partir do sexto mês, no entanto, não foi possível encontrar diferença estatística entre os grupos ($p = 0,133$), provavelmente isso tenha ocorrido devido à maior incidência de infecções entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo que não desenvolveram DECH-C no terceiro mês (Figura 37).

Teste estatístico: EEG com distribuição binomial e função de ligação logito

Figura 37. Incidência de infecção ao longo do primeiro ano de TCTH, separada em três grupos – TCTH-alo com DECH-C, TCTH-alo sem DECH e TCTH-auto

Ao final do primeiro ano, somente 16,1% (19/118 pacientes) dos pacientes não apresentaram infecção de qualquer natureza com necessidade de tratamento hospitalar, sendo que entre os pacientes, 100% haviam sido submetidos ao TCTH-auto (Figura 38).

Figura 38. Distribuição dos episódios de infecção entre: bactérias, vírus e fungos

A mediana de sjTREC foi estatisticamente maior aos nove e 12 meses em comparação a três e seis meses ($p < 0,05$), independente da ocorrência de DECH-C. Por outro lado, a incidência de infecção foi estatisticamente maior aos três meses que nos demais momentos avaliados ($p < 0,05$) e também houve redução estatisticamente significativa de seis para 12 meses ($p = 0,012$) independente do grupo (Tabela 18).

Tabela 18. Resultado das comparações múltiplas do DECH-C e da infecção em geral (bacteriana e/ou viral e/ou fúngica) segundo tipo de TCTH, presença de DECH-C e tempo (3, 6, 9 e 12 meses)

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
sjTREC	3 meses - 6 meses	-50,10	27,73	1	0,425	-123,27	23,07
	3 meses - 9 meses	-255,77	59,73	1	< 0,001	-413,34	-98,19
	3 meses - 12 meses	-366,59	81,91	1	< 0,001	-582,69	-150,49
	6 meses - 9 meses	-205,67	55,98	1	0,001	-353,35	-57,98
	6 meses - 12 meses	-316,49	82,16	1	0,001	-533,24	-99,74
	9 meses - 12 meses	-110,82	83,20	1	> 0,999	-330,32	108,67
Infecção Geral (%)	3 meses - 6 meses	32,0	9,1	1	0,003	8,0	56,0
	3 meses - 9 meses	39,0	9,3	1	< 0,001	14,0	63,0
	3 meses - 12 meses	43,0	9,0	1	< 0,001	20,0	67,0
	6 meses - 9 meses	7,0	3,9	1	0,423	-3,0	17,0
	6 meses - 12 meses	12,0	3,8	1	0,012	2,0	22,0
	9 meses - 12 meses	5,0	2,9	1	0,647	-3,0	12,0

Comparações múltiplas de Bonferroni, gl: grau de liberdade

Além disso, para melhor detalhamento, todos os pacientes com quantificação de sjTREC ao fim do primeiro ano do TCTH foram relacionados de forma retrógrada aos seus respectivos momentos de enxertia medular (n= 76) (Figura 39).

Os pacientes submetidos ao TCTH-auto (n= 31) apresentaram média de 11 dias e variação entre mínimo e máximo de nove a 17 dias. Por outro lado, os pacientes submetidos ao TCTH-alo que desenvolveram DECH-C (n= 25) apresentaram média de 15 dias, com variação entre sete e 19 dias, enquanto que os que não desenvolveram DECH-C (n= 20) apresentaram média de 16 dias, com variação entre 11 e 20 dias. Os pacientes submetidos ao TCTH-auto apresentaram recuperação medular mais precoce do que os pacientes submetidos ao TCTH-alo ($p < 0,001$). Não houve diferença nas médias de enxertia entre os dois grupos de TCTH-alo ($p = 0,141$). Entre todos os pacientes, a média de enxertia foi de 13 dias.

Após o primeiro ano do TCTH, os pacientes que desenvolveram DECH-C (n= 25) apresentaram sjTREC com variação entre 10 a 3.853 cópias, média de 427 (CI 95%: 96 a 758); mediana de 147 (percentil 25%: 57 e 75%: 402). Entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo que não apresentaram DECH-C (n= 20), a quantidade de sjTREC variou entre 27 e 3.282 cópias, média de 685 (IC 95%: 341 a 1.028), mediana de 477 (percentil 25%: 238 e 75%: 1.015). Em relação aos pacientes submetidos ao TCTH-auto (n= 31), a quantidade de sjTREC variou entre 10 a 2.363, com média de 434 (IC 95%: 217 a 651), mediana de 227 (percentil 25%: 10 e 75%: 2.363). A mediana de todos os pacientes foi de 247 cópias.

A média de enxertia medular de 13 dias foi associada com a mediana de 247 sjTREC cópias/ μ g de DNA da função tímica aos 12 meses. Os três grupos de pacientes (TCTH-alo com DECH-C, TCTH-alo sem DECH-C e TCTH-auto) foram comparados nesse cruzamento de dados e dispostos em quatro zonas (quadrantes) (Figura 39).

Os três grupos, compostos de quatro zonas (A à D) foram designados como: A- enxertia medular precoce e função tímica com baixo valor (≤ 13 dias e ≤ 247 sjTREC cópias); B- enxertia medular precoce e função tímica com alto valor (≤ 13 dias e > 247 sjTREC cópias); C- enxertia medular tardia e função tímica com baixo valor (> 13 dias e ≤ 247 sjTREC cópias); D- enxertia medular tardia e função tímica com alto valor (> 13 dias e > 247 sjTREC cópias) (Figura 39; Tabela 19).

Figura 39. Distribuição dos pacientes de acordo com a enxertia medular e função tímica aos 12 meses do TCTH

Tabela 19. Distribuição dos pacientes de acordo com tempo de enxertia medular, função tímica aos 12 meses do TCTH e tipos de infecção (geral ou específica bacteriana e para o CMV)

Enxertia medular e cópias sjTREC /µg DNA			Incidência de infecções até o primeiro ano do TCTH								
Setores*	Média de dias	Média de cópias	Infecções em geral**			Infecções bacterianas			Infecções por CMV		
Grupo 1			ausente	presente	p	ausente	presente	p	ausente	presente	p
1-A	≤ 13	≤ 271	I	5 (20%)		1 (4%)	4 (16%)		1 (4%)	4 (16%)	
1-B	≤ 13	> 271	I	5 (20%)		I	5 (20%)		2 (4%)	4 (16%)	
1-C	> 13	≤ 271	I	11 (44%)		2 (8%)	9 (36%)		2 (8%)	9 (36%)	
1-D	> 13	> 271	I	4 (16%)	0,178	I	4 (16%)	0,587	3 (12%)	1 (4%)	0,156
Grupo 2	Dias	Cópias	ausente	presente	p	ausente	presente	p	ausente	presente	p
2-A	≤ 13	≤ 271	I	1 (5%)		1 (5%)	I		I	1 (5%)	
2-B	≤ 13	> 271	I	4 (20%)		3 (15%)	1 (5%)		I	4 (20%)	
2-C	> 13	≤ 271	I	5 (20%)		2 (10%)	2 (10%)		I	4 (20%)	
2-D	> 13	> 271	I	11 (55%)	0,013	6 (30%)	5 (25%)	0,719	2 (10%)	9 (45%)	0,611
Grupo 3	Dias	Cópias	ausente	presente	p	ausente	presente	p	ausente	presente	p
3-A	≤ 13	≤ 271	6 (19,4%)	11 (35,5%)		7 (22,6%)	10 (32,3%)		17 (54,8%)	I	
3-B	≤ 13	> 271	7 (22,6%)	4 (12,9%)		11 (35,5%)	I		11 (35,5%)	I	
3-C	> 13	≤ 271	I	I		I	I		NI	I	
3-D	> 13	> 271	1 (3,2%)	2 (6,5%)	0,308	1 (3,2%)	2 (6,5%)	0,004	3 (9,7%)	I	0,008

* Setores: Grupo 1: TCTH-alo com DECH-C (25 pacientes, 32,9%); Grupo 2: TCTH-alo sem DECH-C (20 pacientes, 26,3%); Grupo 3: TCTH-autólogo (20 pacientes, 26,3%)

** 7,6% de outras infecções (fungos e outros vírus) não foram computadas em separado, mas foram inseridas nas infecções em geral que incluíram também as bacterianas e por CMV

Legendas: alo: alogênico; auto: autólogo; CMV: citomegalovírus; DNA: ácido desoxirribonucleico; I: dado inexistente; TCTH: transplante de células-tronco hematopoéticas

Ao ser considerado todos os pacientes, a incidência de infecções virais e bacterianas foi quase semelhante (61% versus 63,6%, $p= 805$). A incidência de infecção fúngica (8,3%) foi 7,5 vezes mais baixa do que infecções virais ou bacterianas ($p< 0,001$).

Cada paciente foi avaliado em relação a sua enxertia medular, taxa de recuperação tímica após o primeiro ano do TCTH e a incidência de infecções em geral (bactéria e/ou viral e/ou fúngica) ou no detalhe, bacterianas e por CMV.

Particularmente, entre esses 76 pacientes não houve um padrão majoritário de apresentação, ou seja, todos os pacientes dos três grupos (TCTH-alo sem DECH-C, TCTH-alo com DECH-C e TCTH-auto) apresentaram enxertia precoce ou tardia e função tímica com valor baixo ou alto de acordo considerando as respectivas média e mediana de 13 dias e 247 cópias de sjTREC (Figura 39).

Foi observado que os pacientes se distribuíram por todos os quadrantes, com pequenas diferenças entre cada área de cada grupo (círculos sobre os setores ou zonas), à exceção do grupo de pacientes submetidos ao TCTH-auto, pois nenhum paciente apresentou enxertia medular tardia (>13 dias) com posterior função tímica diminuída (<247 cópias / μ g DNA) ao final do primeiro ano de TCTH (quadrante C) (Figura 39).

Além disso, cada um entre os 76 pacientes foi relacionado com os episódios de infecção que ocorreram ao longo do primeiro ano e foi separado por grupos de acordo com o tipo de transplante, DECH-C, tempo de enxertia e função tímica.

Ao se tentar “expremer” um pouco a observação da tabela 19, pôde ser notado que os pacientes com enxertia medular precoce (≤ 13 dias) apresentaram taxa de infecção geral levemente menor (30/63; 47,6% de infecções presentes) em relação aos pacientes com enxertia medular tardia (>13 dias) (33/63; 52,4% de infecções presentes), porém essa diferença não foi significativa ($p=0,705$) (Setores A e B versus C e D). Por outro lado, os pacientes com enxertia medular precoce (≤ 13 dias) apresentaram maior ausência de episódios de infecção bacteriana (23/76 do total; 30,3%) do que os pacientes com enxertia medular mais tardia (>13 dias) (11/76 do total; 14,5%) ($p=0,040$). O mesmo fato ocorreu para infecções por CMV, nos quais 39,5% (30/76 do total) dos pacientes com enxertia medular precoce tiveram ausência de infecção por CMV contra 13,2% dos pacientes com enxertia medular tardia (10/76) ($p=0,002$) (Setores A e B versus C e D) (Tabela 19).

Curiosamente, ao detalhar os grupos, os pacientes submetidos ao TCTH-alo que não desenvolveram DECH-C (grupo 2) e que apresentaram enxertia tardia (>13 dias), mas atingiram valores altos de sjTREC (>247 cópias) (quadrante D) apresentaram maior índice de infecções em geral (55%) do que demais quadrantes ($p=0,013$), porém isso não ocorreu com os outros dois grupos (1 e 3). Por outro lado, entre o grupo de pacientes submetidos ao TCTH-auto (grupo 3), aqueles que tiveram enxertia medular mais precoce (≤ 13 dias) e valores mais altos de sjTREC (>247 cópias) (quadrante B) apresentaram maior índice de infecção bacteriana (35,5%) do que os outros três quadrantes (A, C ou D) ($p=0,004$), mas isso não ocorreu com os outros dois grupos (1 e 2). Não houve episódios de infecção por CMV entre os pacientes submetidos ao TCTH-auto (grupo 3). Entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo, não houve diferença significativa na incidência por CMV nos pacientes que apresentaram DECH-C em relação aos que não apresentaram ($p=0,463$) (grupos 1 e 2).

4.2.5 Recuperação da função tímica, tipo de TCTH-alo e ATG

A taxa de evolução da função tímica (sjTREC), ao longo do tempo, foi considerada entre os pacientes que receberam ATG (globulina antitimócitos) em comparação com os pacientes que não receberam ATG. A média de sjTREC foi semelhante entre os dois grupos (p grupo= 0,292), sendo que, em ambos os grupos, houve recuperação da função tímica ao longo do tempo, independentemente do uso de ATG (p momento= 0,002) (Tabelas 20 e 22).

Tabela 20. Relação entre os pacientes que receberam ATG e a evolução de sjTREC

Variável/Momento	ATG		P ATG	P Momento	P Interação
	Não	Sim			
sjTREC			0,292	0,002	0,946
3 meses					
média±DP	159,7±210,2	112,3±224,2			
mediana (mín.; máx.)	95,5 (10; 958,9)	31,1 (10; 770,4)			
6 meses					
média±DP	193,1±245,7	154,5±224,1			
mediana (mín.; máx.)	117,9 (10; 1220,5)	85,5 (10; 770,4)			
9 meses					
média±DP	446,9±594,5	334,1±304,5			
mediana (mín.; máx.)	243 (10; 2665,6)	252,4 (10; 875,7)			
12 meses					
média±DP	559,8±853,1	478,4±422,8			
mediana (mín.; máx.)	275 (12,8; 3853,2)	400,1 (10; 1287,5)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: ATG: globulina antitimócito; DP: desvio padrão; máx: máximo; mín: mínimo

Também não houve diferença na recuperação da função tímica entre os pacientes TCTH-alo com doadores aparentados em relação aos doadores não aparentados (p grupo= 0,150), somente em relação ao tempo (p momento< 0,001) (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21. Relação entre a compatibilidade HLA e a evolução de sjTREC

Variável/Momento	Doador		P grupo	P Momento	P Interação
	Aparentado	Não aparentado			
sjTREC			0,150	< 0,001	0,996
3 meses	(n= 51)	(n= 10)			
média±DP	171,6±225	46,5±54,1			
mediana (mín.; máx.)	95,5 (10; 958,9)	20,5 (10; 152,7)			
6 meses	(n= 44)	(n= 8)			
média±DP	202,1±256,9	95,6±58,4			
mediana (mín.; máx.)	117,9 (10; 1220,5)	85,5 (18,1; 202)			
9 meses	(n=45)	(n= 8)			
média±DP	438,6±584,6	352,5±315,1			
mediana (mín.; máx.)	243 (10; 2665,6)	252,4 (38,1; 875,7)			
12 meses	(n= 36)	(n= 9)			
média±DP	565,2±841,5	447,6±436,4			
mediana (mín.; máx.)	288,1 (12,8; 3853,2)	341,9 (10; 1287,5)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: HLA: antígeno leucocitário humano; DP: desvio padrão; máx: máximo; mín: mínimo

Tabela 22. Evolução de sjTREC ao longo do tempo, interação entre os pacientes que receberam ATG e os que não receberam ATG e entre os pacientes (HLA aparentados e os não aparentados)

Comparação		Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
3 meses -	6 meses	-46,06	30,89	1	0,816	-127,56	35,45
3 meses -	9 meses	-288,80	88,39	1	0,007	-522,01	-55,59
3 meses -	12 meses	-397,95	111,84	1	0,002	-693,02	-102,87
6 meses -	9 meses	-242,74	86,05	1	0,029	-469,75	-15,73
6 meses -	12 meses	-351,89	112,93	1	0,011	-649,82	-53,95
9 meses	12 meses	-109,14	124,42	1	>0,999	-437,40	219,11

Comparações múltiplas de Bonferroni

Legenda: alo: alogênico; auto: autólogo; ATG: globulina antitumócito; HLA: antígeno leucocitário humano; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

4.2.6 Função tímica e óbito

A taxa total de óbitos ao final do primeiro ano do TCTH foi de 25,4%, sendo 32% deles relacionados ao TCTH-alo (24/75) e 14% (6/43) ao TCTH-auto.

Em nenhum momento, o sjTREC apresentou diferença na média entre os pacientes que faleceram em relação aos que permaneceram vivos após um ano de TCTH (p interação= 0,233); mas houve alteração nas médias de sjTREC com o passar do tempo em todos os grupos (p momento= 0,001) (Tabelas 23 e 24).

Tabela 23. Evolução de sjTREC ao longo do tempo entre pacientes vivos e óbitos

Variável/Momento	TCTH/Status			
	TCTH-auto vivo	TCTH-auto óbito	TCTH-alo vivo	TCTH-alo óbito
sjTREC				
3 meses				
média±DP	79,9±96,4	285±515,5	132±173,1	215,2±308,3
mediana (mín.; máx.)	47,3 (10; 444,2)	75,8 (16,6; 1204,5)	79,5 (10; 770,4)	104,5 (10; 958,9)
6 meses				
média±DP	159±205,9	64,8±41,8	188,1±231	170±313,2
mediana (mín.; máx.)	93,1 (10; 1023,7)	41,5 (39,7; 113)	108,8 (10; 1220,5)	13,9 (10; 866,2)
9 meses				
média±DP	314,2±579		409,7±472,1	550,1±1041,5
mediana (mín.; máx.)	137,1 (10; 2595,3)		245,2 (10; 2143,1)	114,5 (10; 2665,6)
12 meses				
média±DP	434±590,3	p grupo: 0,549 p momento: 0,001 p interação: 0,233	578,5±801,3	164,7±179,9
Mediana (mín.; máx.)	227,3 (10; 2363,2)		321,2 (10; 3853,2)	104,2 (26,8; 423,7)

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: alo: alogênico; auto: autólogo; DP: desvio-padrão; máx.: máximo; mín.: mínimo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoieticas

Tabela 24. Relação de sjTREC ao longo do tempo entre pacientes vivos e óbitos

Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
3 meses - 6 meses	-50,10	27,73	1	0,425	-123,27	23,07
3 meses - 9 meses	-255,77	59,73	1	< 0,001	-413,34	-98,19
3 meses - 12 meses	-366,59	81,91	1	< 0,001	-582,69	-150,49
6 meses - 9 meses	-205,67	55,98	1	0,001	-353,35	-57,98
6 meses - 12 meses	-316,49	82,16	1	0,001	-533,24	-99,74
9 meses - 12 meses	-110,82	83,20	1	>0,999	-330,32	108,67

Comparações múltiplas de Bonferroni

4.2.7 Quantificação de sjTREC, valor preemptivo?

Como a função tímica diminuída se apresentou como fator de risco para DECH-C, foi verificada a possibilidade da quantificação de sjTREC em um momento mais precoce (três meses) servir como exame preditivo para eventos futuros de DECH-C. sjTREC entre dez e 67 cópias/μg de DNA no terceiro mês apresentou 68,8%-100% de sensibilidade e sjTREC entre 95 e >960 cópias/μg de DNA apresentou 69-100% de especificidade para eventos de DECH-C que ocorressem até o fim do primeiro ano do TCTH. Houve a presença de uma zona cinzenta, quando sjTREC se apresentou entre 67 e 95 cópias sjTREC/μg DNA (Figura 40).

Figura 40. Curva ROC da quantificação de sjTREC aos 3 meses do TCTH e eventos futuros de DECH-C. Amostra com 61 pacientes: 32 casos positivos (52,46%) e 29 casos negativos (47,54%)

4.2.8 Recuperação dos linfócitos T e B e das células NK

Os leucócitos podem dividir-se em dois grandes grupos: o grupo de células polimorfonucleares, ou granulócitos, que são os neutrófilos, eosinófilos e basófilos; e o grupo das células mononucleares ou agranulócitos, constituídos por linfócitos, monócitos, macrófagos e células NK. Após o sexto mês de seguimento, os pacientes começaram a ser avaliados para as populações das células mononucleares (linfócitos T CD3⁺ e suas subpopulações, linfócitos B CD19⁺ e células NK CD56⁺) e a produção de citocinas. Ao longo do tempo, o número de linfócitos T CD3⁺ se manteve praticamente estável e independente da função tímica. O número de linfócitos B e de células NK se manteve em torno de 1/5 do número de linfócitos T (Figura 41).

O número de linfócitos B, à medida que o tempo passou, apresentou um ligeiro aumento e o inverso ocorreu em relação às células NK. Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ mantiveram uma relação 1:2 estável nesse período de seis meses de avaliação (seis-12 meses pós-TCTH), com leve declínio do linf T CD8⁺ em oposição ao linf T CD4⁺, que apresentou leve ascensão (Figura 41).

Figura 41. Evolução das células mononucleares (linfócitos T CD3⁺, B CD19⁺ e NK CD56⁺)

As células estão expressas em % da contagem de linfócitos total do dia das coletas do sangue. O CD3% e o CD8% foram em média estatisticamente maiores nos pacientes submetidos ao TCTH-alo que não apresentaram eventos de DECH-C ao longo do primeiro ano do TCTH ($p < 0,05$). O CD8% não apresentou diferença significativa entre TCTH-alo sem DECH-C versus TCTH-alo com DECH-C ($p = 0,051$), no entanto, o comportamento se assemelha ao apresentado pelo CD3% (Tabelas 25, 26 e 28).

O CD19% foi estatisticamente maior nos pacientes submetidos ao TCTH-auto que nos pacientes TCTH-alo sem DECH-C ($p_{\text{grupo}} = 0,028$; Tabela 25) ($p = 0,025$;

Tabela 28). Além disso, houve aumento do CD19% ao longo do tempo, independente do grupo, quando comparado aos seis meses ($p < 0,05$), porém estável entre nove e 12 meses ($p > 0,999$; Tabelas 25 e 28).

O CD56% foi estatisticamente maior no grupo de pacientes TCTH-alo com DECH-C do que no grupo sem DECH-C (p grupo = 0,005; Tabela 25) ($p = 0,005$; Tabela 28). Independentemente do grupo, a mediana do CD56% diminuiu ao longo do tempo (p momento = 0,005; Tabela 25), quando comparado aos seis meses ($p < 0,05$), mas estável entre nove e 12 meses ($p > 0,999$; Tabelas 25 e 28).

Tabela 25. Descrição das subpopulações de células mononucleadas (linfócitos T CD3⁺ e CD19⁺ e células NK) de acordo com eventos de DECH-C e o tempo (seis aos 12 meses)

Variável/Momento	Grupo			p	p	p
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C	Grupo	Momento	Interação
%CD3				0,003	0,563	0,608
6 meses						
média±DP	59,6±15	71,6±10,9	58,8±15,8			
mediana (mín.; máx.)	62,1 (28; 79,3)	73,2 (48,7; 88,6)	61,4 (12,2; 86,4)			
9 meses						
média±DP	59,1±12,3	69,4±13	59,3±14,8			
mediana (mín.; máx.)	58,8 (32,1; 81,8)	73 (36,7; 84,7)	62,8 (19,7; 79,3)			
12 meses						
média±DP	59,2±13,7	69,2±9,1	61,9±15,4			
mediana (mín.; máx.)	57,9 (29,2; 84,6)	69,4 (47,3; 82,1)	65,2 (20,5; 83)			
%CD19				0,028	0,001	0,249
6 meses						
média±DP	16,9±10,7	8,9±6,2	14,1±11,4			
mediana (mín.; máx.)	14,8 (3,7; 43,4)	8,7 (1,7; 24,3)	11 (0,1; 38)			
9 meses						
média±DP	19,2±10,6	12,3±7,8	16±10,8			
mediana (mín.; máx.)	19,1 (1,5; 43,4)	10,3 (3,6; 29,5)	12,4 (0,1; 40,8)			
12 meses						
média±DP	19,1±9,8	14,8±6,5	15,2±10,4			
mediana (mín.; máx.)	18,4 (0,2; 42,3)	14,6 (6,5; 28,3)	13,4 (1,2; 39,3)			
%CD56				0,005	0,005	0,647
6 meses						
média±DP	12,7±6,7	10,9±4,9	14,3±9,8			
mediana (mín.; máx.)	12,1 (2,6; 28)	11,6 (3,7; 18,8)	12,2 (0,8; 40,4)			
9 meses						
média±DP	10,3±5,8	7,1±2,6	12,9±7,7			
mediana (mín.; máx.)	9,7 (1,3; 26,3)	6,8 (2,8; 12,1)	10,5 (1,6; 35,8)			
12 meses						
média±DP	11,4±7,1	7,7±3,4	11,6±8,6			
mediana (mín.; máx.)	9,8 (2,3; 29,9)	6,7 (2,6; 17,9)	11,3 (1,3; 41,2)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade. Legenda: auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; máx.: máximo; mín.: mínimo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Houve um predomínio dos linfócitos T CD3⁺ CD8⁺ no grupo de pacientes TCTH-alo sem DECH em relação ao TCTH-auto (p grupo= 0,005; Tabela 26) (p= 0,003; Tabela 28).

Tabela 26. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺ (CD4⁺ e CD8⁺) de acordo com eventos de DECH-C e o tempo (seis aos 12 meses)

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%CD4				0,714	0,464	0,174
6 meses						
média±DP	18,7±7,1	19,4±6,7	19,5±9			
mediana (mín.; máx.)	17,7 (6,7; 35)	20,8 (9,1; 32,2)	18,5 (2; 37,3)			
9 meses						
média±DP	21,5±9,4	20,1±6,4	17,9±7,3			
mediana (mín.; máx.)	22 (8,4; 54,7)	19,5 (7,2; 29,9)	17,1 (6,8; 35,4)			
12 meses						
média±DP	21,3±6	20,9±5,1	19,6±7,8			
mediana (mín.; máx.)	20,7 (9,2; 35,9)	22,1 (11,7; 29,1)	18,7 (6,6; 37,8)			
%CD8				0,005	0,416	0,212
6 meses						
média±DP	37,6±13,2	46,8±14,7	35,2±13,4			
mediana (mín.; máx.)	36,1 (10,1; 65,2)	47,3 (17; 74,2)	31,8 (9,8; 63,3)			
9 meses						
média±DP	32,6±14,1	44,8±13	37,4±14,8			
mediana (mín.; máx.)	31,3 (4,5; 70,3)	47 (26,5; 66)	35,6 (11; 64,9)			
12 meses						
média±DP	34,1±13,6	44,4±11,9	38,2±14,7			
mediana (mín.; máx.)	32,3 (9,7; 70,4)	45,4 (20; 66,8)	38,9 (10,7; 67,9)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas; auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; máx.: máximo; mín.: mínimo

O ETRCD4% aumentou em média estatisticamente a cada momento, independente do grupo (p momento < 0,001; Tabela 27) (p< 0,05; Tabela 28), no entanto o ETRCD8% diminuiu em média estatisticamente de seis para 12 meses somente no grupo TCTH-alo sem DECH-C (p interação< 0,001 e p grupo= 0,05; Tabela 27) (p= 0,048; Tabela 28).

Tabela 27. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺ (ETR CD4⁺ e ETR CD8⁺) de acordo com eventos de DECH-C e o tempo (seis aos 12 meses)

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%ETR CD4				0,064	< 0,001	0,073
6 meses						
média±DP	1,05±0,88	2,36±1,99	1,81±1,38			
mediana (mín.; máx.)	0,82 (0,07; 3,85)	2,49 (0,05; 7,45)	1,73 (0,02; 4,66)			
9 meses						
média±DP	2,25±1,91	3,63±2,72	1,89±1,61			
mediana (mín.; máx.)	1,64 (0,09; 7,94)	2,65 (0,83; 10,26)	1,54 (0,07; 6,19)			
12 meses						
média±DP	2,52±2,07	4,38±3,34	2,55±2,26			
mediana (mín.; máx.)	1,76 (0,1; 8,21)	3,05 (0,88; 11,39)	1,93 (0,11; 8,61)			
%ETR CD8				0,050	0,121	< 0,001
6 meses						
média±DP	13,4±9,8	17,9±8,5	12,4±6,8			
mediana (mín.; máx.)	11,9 (2,5; 43,1)	18,8 (2,4; 31,5)	11,4 (4,9; 28,4)			
9 meses						
média±DP	11,6±9,5	18,6±8	13,8±8,6			
mediana (mín.; máx.)	10,2 (0,5; 47)	15,8 (7; 36,3)	11 (1,9; 37,4)			
12 meses						
média±DP	13±9,7	15,8±7,6	13,4±7,2			
mediana (mín.; máx.)	9,4 (1,9; 49,5)	13,9 (1,3; 34,7)	12,9 (1,8; 30,4)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Tabela 28. Resultado das comparações múltiplas das populações de células estudadas em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
%CD3	TCTH-auto -	TCTH-alo sem DECH-C	-11,15	3,43	1	0,003	-19,36
	TCTH-auto -	TCTH-alo com DECH-C	-1,21	2,83	1	>0,999	-7,98
	TCTH-alo sem DECH-C -	TCTH-alo com DECH-C	9,93	3,47	1	0,012	1,64
%CD19	TCTH-auto -	TCTH-alo sem DECH-C	6,09	2,30	1	0,025	0,58
	TCTH-auto -	TCTH-alo com DECH-C	3,06	2,36	1	0,589	-2,60
	TCTH-alo sem DECH-C -	TCTH-alo com DECH-C	-3,04	2,09	1	0,439	-8,05
	6 meses -	9 meses	-2,80	0,78	1	0,001	-4,68
	6 meses -	12 meses	-3,20	1,00	1	0,004	-5,58
	9 meses	12 meses	-0,40	0,79	1	>0,999	-2,30
							1,50
%CD56	TCTH-auto -	TCTH-alo sem DECH-C	2,59	1,26	1	0,121	-0,43
	TCTH-auto -	TCTH-alo com DECH-C	-1,83	1,42	1	0,588	-5,23
	TCTH-alo sem DECH-C -	TCTH-alo com DECH-C	-4,43	1,40	1	0,005	-7,79
	6 meses -	9 meses	2,60	0,80	1	0,003	0,68
	6 meses -	12 meses	2,39	0,94	1	0,034	0,13
	9 meses	12 meses	-0,21	0,65	1	>0,999	-1,76
							1,34
%CD8	TCTH-auto -	TCTH-alo sem DECH-C	-12,38	3,80	1	0,003	-21,48
	TCTH-auto -	TCTH-alo com DECH-C	-3,04	2,96	1	0,912	-10,12
	TCTH-alo sem DECH-C -	TCTH-alo com DECH-C	9,34	3,92	1	0,051	-0,04
%ETR CD4	6 meses -	9 meses	-0,64	0,17	1	0,001	-1,06
	6 meses -	12 meses	-1,20	0,24	1	< 0,001	-1,78
	9 meses	12 meses	-0,55	0,18	1	0,008	-0,99
%ETR CD8	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-auto (9 meses)	0,07	0,49	1	>0,999	-1,51
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-auto (12 meses)	-1,29	0,63	1	>0,999	-3,32
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	-9,17	3,06	1	0,098	-18,94
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-6,94	2,72	1	0,386	-15,63
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-4,74	2,47	1	>0,999	-12,64
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-1,82	1,97	1	>0,999	-8,13
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-2,96	2,07	1	>0,999	-9,56
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-1,92	1,98	1	>0,999	-8,25
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-auto (12 meses)	-1,36	0,44	1	0,078	-2,79
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	-9,24	3,04	1	0,087	-18,97
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-7,01	2,70	1	0,342	-15,64
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-4,81	2,45	1	>0,999	-12,65
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-1,89	1,95	1	>0,999	-8,13
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-3,03	2,04	1	>0,999	-9,56
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-1,99	1,96	1	>0,999	-8,25
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	-7,87	3,11	1	0,405	-17,80
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-5,64	2,77	1	>0,999	-14,50
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-3,45	2,53	1	>0,999	-11,53
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,52	2,05	1	>0,999	-7,07
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-1,66	2,13	1	>0,999	-8,49
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-0,62	2,05	1	>0,999	-7,19
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	2,23	1,12	1	>0,999	-1,35
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	4,42	1,38	1	0,048	0,01
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	7,35	3,16	1	0,720	-2,75
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	6,21	3,22	1	>0,999	-4,07
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	7,25	3,16	1	0,789	-2,86
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	2,19	0,76	1	0,147	-0,25
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	5,12	2,83	1	>0,999	-3,93
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	3,98	2,89	1	>0,999	-5,27
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	5,02	2,83	1	>0,999	-4,04
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	2,93	2,59	1	>0,999	-5,36
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	1,79	2,66	1	>0,999	-6,72
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	2,83	2,60	1	>0,999	-5,48
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-1,14	0,52	1	>0,999	-2,80
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-0,10	0,66	1	>0,999	-2,22
	TCTH-alo com DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	1,04	0,49	1	>0,999	-0,53
							2,60

Comparações múltiplas de Bonferroni

Legenda: auto: autólogo; alo: alógeno; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

A subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ *naive*% foi estatisticamente maior no grupo TCTH-alo sem DECH-C em relação ao TCTH-auto (p grupo= 0,025; Tabela 29) (p= 0,027; Tabela 31) e aumentou estatisticamente a cada momento da avaliação, independente do grupo (p momento < 0,001; Tabela 29) (p< 0,05; Tabela 31). Por outro lado, em seu componente ativado (linf T CD3⁺CD4⁺ *naive* ativado%) não foi possível encontrar diferenças (p> 0,05; Tabela 31) apesar de ter apresentado diferença estatisticamente significativa no comportamento (p interação= 0,045; Tabela 30).

Tabela 29. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (*naive*, mem cen, efet, mem efet) de acordo com eventos de DECH-C e o tempo (6 aos 12 meses)

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%Naive CD4				0,025	< 0,001	0,134
6 meses						
média±DP	1,15±0,93	2,54±2,17	2±1,7			
mediana (mín.; máx.)	1,01 (0,09; 3,58)	2,14 (0,05; 7,25)	1,58 (0,01; 7,64)			
9 meses						
média±DP	2,05±1,92	3,71±3,29	2,24±1,91			
mediana (mín.; máx.)	1,53 (0,03; 8,7)	2,89 (0,02; 10,82)	1,74 (0,01; 6,66)			
12 meses						
média±DP	2,34±2,14	4,3±3,2	2,58±2,23			
mediana (mín.; máx.)	1,64 (0,02; 7,98)	3,14 (0,3; 11,16)	2,18 (0,01; 8,61)			
%Mem Cen CD4				0,115	0,960	0,819
6 meses						
média±DP	3,84±2,17	3,25±1,74	3,58±2,54			
mediana (mín.; máx.)	2,95 (0,47; 9,3)	2,91 (0,56; 6,64)	3,15 (0,11; 12,61)			
9 meses						
média±DP	4,32±2,8	3±1,46	3,64±2,24			
mediana (mín.; máx.)	3,87 (0,48; 12,32)	2,98 (0,02; 5,65)	3,3 (0,11; 9,75)			
12 meses						
média±DP	4,14±2,51	3,09±1,29	3,69±1,94			
mediana (mín.; máx.)	4,09 (0,53; 9,68)	3,08 (1,03; 7,1)	3,66 (0,12; 8,1)			
%Efet CD4				0,751	0,613	0,900
6 meses						
média±DP	1,13±1,51	1,14±1,36	1,92±3,12			
mediana (mín.; máx.)	0,42 (0,03; 6,88)	0,61 (0,08; 5,46)	0,75 (0,19; 14,97)			
9 meses						
média±DP	1,74±2,37	1,62±1,29	1,47±2,02			
mediana (mín.; máx.)	0,94 (0,07; 8,66)	1,34 (0,26; 5,48)	0,69 (0,07; 8,17)			
12 meses						
média±DP	1,87±4,53	1,62±1,01	1,89±2,16			
mediana (mín.; máx.)	0,74 (0,04; 25,89)	1,75 (0,26; 4,05)	0,9 (0,08; 7,18)			
%Mem Efet CD4				0,720	0,162	0,484
6 meses						
média±DP	6,24±4,6	5,5±2,33	6,19±2,94			
mediana (mín.; máx.)	5,76 (0,87; 25,41)	5,18 (1,88; 9,8)	6,29 (0,51; 12,73)			
9 meses						
média±DP	6,36±3	5,7±2,44	5,2±2,81			
mediana (mín.; máx.)	6,46 (0,85; 12,37)	5,11 (2,12; 11,23)	4,39 (1,2; 12,99)			
12 meses						
média±DP	6,64±2,83	6,83±3,68	6,84±4,56			
mediana (mín.; máx.)	6,46 (2,12; 14,85)	5,64 (2,57; 14,14)	6,47 (0,47; 20,94)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; máx.: máximo; mín.: mínimo; mem: memória; cen: central; efet.: efetora; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

A subpopulação de células T CD3⁺CD4⁺ Mem cen ativada% foi em média estatisticamente menor aos 12 meses do que aos seis meses (p momento= 0,012; Tabela 30) (p= 0,013; Tabela 32), enquanto que, na subpopulação de células T CD3⁺CD4⁺ efet ativada%, não foi possível identificar entre quais grupos ou momentos (p interação = 0,038; Tabela 30) ocorreram as diferenças (p> 0,05; Tabela 32).

Tabela 30. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (*naive*, mem cen, efet, mem efet) em estado de ativação, de acordo com eventos de DECH-C e o tempo

Variável/Momento	Grupo			P Grupo	P Momento	P Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%Naive ativado				0,148	0,005	0,045
6 meses						
média±DP	0,016±0,013	0,014±0,011	0,021±0,02			
mediana (mín.; máx.)	0,011 (0; 0,053)	0,009 (0; 0,036)	0,014 (0; 0,073)			
9 meses						
média±DP	0,07±0,19	0,037±0,043	0,019±0,019			
mediana (mín.; máx.)	0,015 (0; 0,931)	0,021 (0; 0,171)	0,013 (0,002; 0,095)			
12 meses						
média±DP	0,052±0,082	0,036±0,042	0,026±0,032			
mediana (mín.; máx.)	0,021 (0,001; 0,323)	0,019 (0,002; 0,153)	0,015 (0,002; 0,15)			
%Mem Cen ativada				0,075	0,012	0,161
6 meses						
média±DP	0,12±0,08	0,2±0,15	0,39±1,12			
mediana (mín.; máx.)	0,12 (0,01; 0,36)	0,19 (0,02; 0,41)	0,17 (0,01; 5,73)			
9 meses						
média±DP	0,14±0,13	0,13±0,09	0,16±0,17			
mediana (mín.; máx.)	0,1 (0,01; 0,62)	0,14 (0,01; 0,32)	0,12 (0,01; 0,69)			
12 meses						
média±DP	0,09±0,08	0,13±0,09	0,09±0,11			
mediana (mín.; máx.)	0,08 (0,01; 0,37)	0,11 (0,01; 0,34)	0,06 (0,01; 0,52)			
%Efet ativada				0,050	0,022	0,038
6 meses						
média±DP	0,063±0,074	0,073±0,068	0,311±0,544			
mediana (mín.; máx.)	0,033 (0,006; 0,324)	0,064 (0; 0,24)	0,083 (0,032; 2,305)			
9 meses						
média±DP	0,34±0,932	0,098±0,089	0,177±0,361			
mediana (mín.; máx.)	0,047 (0,006; 4,267)	0,074 (0; 0,422)	0,049 (0,003; 1,7)			
12 meses						
média±DP	0,103±0,204	0,088±0,07	0,076±0,071			
mediana (mín.; máx.)	0,037 (0,004; 1,062)	0,06 (0,021; 0,285)	0,065 (0,004; 0,285)			
%Mem Efet ativada				0,494	0,210	0,551
6 meses						
média±DP	0,35±0,49	0,36±0,32	0,29±0,24			
mediana (mín.; máx.)	0,21 (0,02; 2,17)	0,22 (0,09; 1,03)	0,23 (0,02; 0,97)			
9 meses						
média±DP	0,23±0,19	0,24±0,19	0,25±0,24			
mediana (mín.; máx.)	0,17 (0,03; 0,81)	0,22 (0,07; 0,91)	0,16 (0; 0,82)			
12 meses						
média±DP	0,22±0,29	0,39±0,34	0,24±0,24			
mediana (mín.; máx.)	0,13 (0,02; 1,42)	0,23 (0,06; 1,36)	0,13 (0,02; 0,83)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: auto: autólogo; alo: alogênico; cen: central; DP: desvio-padrão; efet.: efetora; mín.: mínimo; máx.: máximo; mem: memória; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Tabela 31. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3⁺CD4⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo, para *naive* e seu componente ativado

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)		
						Inferior	Superior	
%Naive	TCTH-auto -	TCTH-alo sem DECH-C	-1,55	0,60	1	0,027	-2,98	-0,13
	TCTH-auto -	TCTH-alo com DECH-C	-0,56	0,41	1	0,506	-1,53	0,41
	TCTH-alo sem DECH-C -	TCTH-alo com DECH-C	0,99	0,63	1	0,348	-0,52	2,51
	6 meses -	9 meses	-0,60	0,19	1	0,004	-1,05	-0,15
	6 meses -	12 meses	-1,16	0,28	1	< 0,001	-1,82	-0,50
	9 meses	12 meses	-0,56	0,22	1	0,030	-1,09	-0,04
%Naive ativado	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-auto (9 meses)	-0,042	0,016	1	0,339	-0,095	0,010
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-auto (12 meses)	-0,031	0,014	1	0,754	-0,074	0,012
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	0,005	0,009	1	>0,999	-0,023	0,032
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-0,017	0,014	1	>0,999	-0,060	0,026
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-0,015	0,013	1	>0,999	-0,055	0,026
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,003	0,009	1	>0,999	-0,033	0,026
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	0,001	0,008	1	>0,999	-0,025	0,027
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-0,006	0,010	1	>0,999	-0,037	0,025
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-auto (12 meses)	0,011	0,016	1	>0,999	-0,041	0,064
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	0,047	0,019	1	0,425	-0,013	0,107
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	0,025	0,021	1	>0,999	-0,043	0,094
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	0,028	0,021	1	>0,999	-0,039	0,095
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	0,039	0,019	1	>0,999	-0,022	0,100
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	0,043	0,019	1	0,721	-0,016	0,102
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,036	0,019	1	>0,999	-0,025	0,098
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	0,036	0,015	1	0,530	-0,011	0,083
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	0,014	0,018	1	>0,999	-0,043	0,072
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	0,017	0,017	1	>0,999	-0,039	0,073
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	0,028	0,015	1	>0,999	-0,020	0,076
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	0,032	0,014	1	0,998	-0,014	0,078
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,025	0,015	1	>0,999	-0,024	0,074
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-0,022	0,011	1	>0,999	-0,057	0,014
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-0,019	0,011	1	>0,999	-0,056	0,017
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,008	0,009	1	>0,999	-0,036	0,020
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-0,004	0,008	1	>0,999	-0,029	0,021
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-0,011	0,009	1	>0,999	-0,041	0,019
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	0,002	0,012	1	>0,999	-0,035	0,039
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	0,014	0,014	1	>0,999	-0,030	0,057
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	0,018	0,013	1	>0,999	-0,024	0,059
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,011	0,014	1	>0,999	-0,034	0,056
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	0,011	0,013	1	>0,999	-0,030	0,053
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	0,015	0,012	1	>0,999	-0,024	0,054
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,008	0,013	1	>0,999	-0,034	0,051
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	0,004	0,006	1	>0,999	-0,016	0,024
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-0,003	0,009	1	>0,999	-0,030	0,025
	TCTH-alo com DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-0,007	0,006	1	>0,999	-0,027	0,014

Comparações múltiplas de Bonferroni

Legenda: auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; máx.: máximo; mín.: mínimo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Tabela 32. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3⁺CD4⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo, para men cen ativada e efet ativada

Variável	Comparação		Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
							Inferior	Superior
%Mem Cen ativada	6 meses -	9 meses	0,091	0,047	1	0,160	-0,022	0,203
	6 meses -	12 meses	0,131	0,046	1	0,013	0,021	0,241
	9 meses	12 meses	0,041	0,026	1	0,372	-0,023	0,104
%efet ativada	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-auto (9 meses)	-0,245	0,104	1	0,688	-0,579	0,089
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-auto (12 meses)	-0,039	0,042	1	>0,999	-0,174	0,095
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	-0,006	0,045	1	>0,999	-0,151	0,140
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-0,021	0,044	1	>0,999	-0,163	0,121
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-0,013	0,042	1	>0,999	-0,147	0,120
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,228	0,104	1	>0,999	-0,560	0,105
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-0,114	0,064	1	>0,999	-0,320	0,091
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-0,002	0,037	1	>0,999	-0,119	0,115
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-auto (12 meses)	0,205	0,104	1	>0,999	-0,126	0,537
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	0,239	0,111	1	>0,999	-0,117	0,595
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	0,224	0,111	1	>0,999	-0,131	0,579
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	0,232	0,110	1	>0,999	-0,120	0,583
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	0,017	0,145	1	>0,999	-0,448	0,482
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	0,130	0,120	1	>0,999	-0,254	0,515
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,242	0,108	1	0,898	-0,103	0,588
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	0,034	0,049	1	>0,999	-0,124	0,192
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	0,019	0,048	1	>0,999	-0,136	0,174
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	0,026	0,046	1	>0,999	-0,121	0,173
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,188	0,106	1	>0,999	-0,526	0,150
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-0,075	0,067	1	>0,999	-0,289	0,140
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,037	0,041	1	>0,999	-0,095	0,169
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-0,015	0,046	1	>0,999	-0,163	0,133
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-0,007	0,047	1	>0,999	-0,159	0,144
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,222	0,107	1	>0,999	-0,563	0,119
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-0,109	0,069	1	>0,999	-0,328	0,111
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,003	0,044	1	>0,999	-0,137	0,143
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	0,008	0,042	1	>0,999	-0,126	0,141
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,207	0,106	1	>0,999	-0,547	0,133
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-0,094	0,068	1	>0,999	-0,311	0,124
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,018	0,043	1	>0,999	-0,118	0,155
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,215	0,105	1	>0,999	-0,551	0,122
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-0,101	0,066	1	>0,999	-0,313	0,110
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,011	0,040	1	>0,999	-0,117	0,138
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	0,113	0,105	1	>0,999	-0,222	0,449
	%Efet ativada	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,225	0,102	1	0,981	-0,101	0,552
	TCTH-alo com DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,112	0,058	1	>0,999	-0,073	0,297

Comparações múltiplas de Bonferroni

Legenda:auto: autólogo; alo: alogênico; cen: central; DP: desvio-padrão; efet.: efetora; mín.: mínimo; máx.: máximo; mem: memória; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

A subpopulação de linf T CD8 *naive*% foi em média maior aos nove meses do que aos seis meses (p momento= 0,041, Tabela 33) (p= 0,050; Tabela 35). A subpopulação de linf T CD3⁺CD8 *efet*% foi em média maior nos pacientes TCTH-alo sem DECH-C aos seis meses do que nos pacientes TCTH-auto em todos os momentos (p grupo= 0,020; Tabela 33) (p< 0,05; Tabela 35) e houve diminuição dessa subpopulação nesse mesmo grupo ao longo dos momentos de avaliação (p interação< 0,001; Tabela 33) (p< 0,05; Tabela 35).

Tabela 33. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ (*naive*, *mem cen*, *efet*, *mem efet*), de acordo com eventos de DECH-C e o tempo

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%Naive				0,067	0,041	0,095
6 meses						
média±DP	1,02±1,13	1,38±1,73	1,07±1,04			
mediana (mín.; máx.)	0,6 (0,03; 5,19)	0,87 (0,07; 7,19)	0,89 (0,06; 3,95)			
9 meses						
média±DP	1±1,54	1,96±3,01	2,38±4,16			
mediana (mín.; máx.)	0,45 (0,01; 6,54)	1,33 (0,1; 14,24)	1,23 (0,05; 23,34)			
12 meses						
média±DP	1,15±1,93	1,8±1,39	1,81±1,62			
mediana (mín.; máx.)	0,51 (0,03; 9,97)	1,69 (0,13; 6,17)	1,62 (0,05; 5,19)			
%Mem cen				0,105	0,337	0,320
6 meses						
média±DP	0,389±0,317	0,303±0,301	0,15±0,143			
mediana (mín.; máx.)	0,23 (0,023; 1,045)	0,189 (0,032; 1,072)	0,096 (0,015; 0,647)			
9 meses						
média±DP	0,282±0,369	0,281±0,243	0,251±0,264			
mediana (mín.; máx.)	0,117 (0,005; 1,383)	0,183 (0,046; 0,862)	0,154 (0,02; 0,97)			
12 meses						
média±DP	0,327±0,532	0,406±0,391	0,28±0,281			
mediana (mín.; máx.)	0,164 (0,031; 2,818)	0,318 (0,034; 1,738)	0,206 (0,021; 1,095)			
%Efet				0,020	< 0,001	< 0,001
6 meses						
média±DP	17,7±13,4	25,2±14,6	18,1±9,7			
mediana (mín.; máx.)	14,3 (2; 64,4)	26,8 (1,5; 56,6)	15,5 (6,6; 35,3)			
9 meses						
média±DP	15,4±14,2	24,7±10,5	18,1±10,4			
mediana (mín.; máx.)	12,4 (1,1; 68,9)	21,9 (9,5; 45,5)	15,4 (3; 44,6)			
12 meses						
média±DP	14,6±12,5	21,5±10,2	17,5±9,5			
mediana (mín.; máx.)	10,9 (0,3; 68,2)	20,4 (2,2; 43,8)	15,6 (2,9; 36)			
%Mem Efet			0,632	0,632	0,689	0,899
6 meses						
média±DP	15,3±9,4	15,1±12,2	14±9,2			
mediana (mín.; máx.)	14,3 (0,4; 45,5)	14,3 (0,1; 54,9)	11,4 (2,3; 40,9)			
9 meses						
média±DP	13,4±8,3	16,1±9,1	14,5±10			
mediana (mín.; máx.)	13,3 (0,1; 32)	15,1 (7,2; 48,2)	11,1 (0,4; 41,8)			
12 meses						
média±DP	15,5±8,6	16,9±10,1	14,9±11,4			
mediana (mín.; máx.)	14,5 (0,6; 40)	16,5 (6,7; 48,2)	12,1 (0; 49,5)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda:auto: autólogo; alo: alogênico; cen: central; DP: desvio-padrão; efet.: efetora; mín.: mínimo; máx.: máximo; mem: memória; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

A subpopulação de linf T CD3⁺CD8⁺ efet ativado% foi em média estatisticamente maior no TCTH-alo sem DECH-C do que no TCTH-auto (p grupo = 0,017; Tabela 34) (p= 0,027; Tabela 35).

Tabela 34. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ (*naive*, mem cen, efet, mem efet) em estado de ativação, de acordo com eventos de DECH-C e o tempo

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%N ativado				0,770	0,408	0,079
6 meses						
média±DP	0,121±0,372	0,108±0,238	0,033±0,036			
mediana (mín.; máx.)	0,025 (0,001; 1,693)	0,031 (0,001; 0,884)	0,017 (0; 0,15)			
9 meses						
média±DP	0,028±0,033	0,065±0,082	0,198±0,71			
mediana (mín.; máx.)	0,016 (0; 0,13)	0,037 (0,002; 0,346)	0,019 (0; 3,85)			
12 meses						
média±DP	0,067±0,174	0,053±0,089	0,059±0,075			
mediana (mín.; máx.)	0,022 (0,002; 0,983)	0,03 (0,002; 0,355)	0,04 (0; 0,342)			
%Mem cen ativada				0,393	0,620	0,311
6 meses						
média±DP	0,036±0,032	0,05±0,071	0,026±0,036			
mediana (mín.; máx.)	0,024 (0,003; 0,105)	0,023 (0,004; 0,266)	0,014 (0; 0,166)			
9 meses						
média±DP	0,031±0,055	0,032±0,034	0,044±0,054			
mediana (mín.; máx.)	0,008 (0; 0,207)	0,02 (0,003; 0,124)	0,02 (0; 0,215)			
12 meses						
média±DP	0,03±0,039	0,05±0,069	0,054±0,078			
mediana (mín.; máx.)	0,013 (0; 0,147)	0,023 (0,005; 0,264)	0,019 (0; 0,252)			
%Efet ativada				0,017	0,118	0,725
6 meses						
média±DP	2,18±2,55	5,57±4,9	3,59±3,89			
mediana (mín.; máx.)	1,53 (0,14; 11,04)	4,92 (0,64; 16,88)	2,41 (0,17; 16,98)			
9 meses						
média±DP	2,26±3,12	3,64±2,86	2,81±2,02			
mediana (mín.; máx.)	1,71 (0,14; 14,64)	2,59 (0,69; 9,93)	2,8 (0,02; 8,4)			
12 meses						
média±DP	1,74±2,23	3,21±2,99	2,47±2,46			
mediana (mín.; máx.)	1,04 (0,02; 12,2)	1,83 (0,31; 10)	1,66 (0,03; 10,96)			
%Mem Efet ativada				0,595	0,448	0,374
6 meses						
média±DP	3,2±3,6	5,1±4,2	3,5±2,4			
mediana (mín.; máx.)	1,9 (0,1; 11,3)	3,7 (0; 11,8)	2,9 (0,4; 9,8)			
9 meses						
média±DP	3,4±5,1	3,4±2,5	3,9±4,3			
mediana (mín.; máx.)	1,2 (0; 23,4)	2,2 (0,8; 8,3)	2,3 (0; 16,1)			
12 meses						
média±DP	3,1±3,8	4±3,8	2,8±2,4			
mediana (mín.; máx.)	1,9 (0,1; 15,2)	2,4 (0,6; 14,5)	2,2 (0; 9,8)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade. Legenda:auto: autólogo; alo: alogênico; cen: central; DP: desvio-padrão; efet.: efetora; mín.: mínimo; máx.: máximo; mem: memória; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Tabela 35. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3⁺CD8⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo

Variável	Comparação		Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
							Inferior	Superior
%Naive	6 meses -	9 meses	-0,63	0,26	1	0,050	-1,27	0,00
	6 meses -	12 meses	-0,56	0,29	1	0,175	-1,26	0,15
	9 meses	12 meses	0,08	0,28	1	>0,999	-0,60	0,75
%Efet	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-auto (9 meses)	1,32	0,59	1	0,921	-0,57	3,21
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-auto (12 meses)	1,62	0,73	1	0,968	-0,72	3,95
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	-15,44	4,75	1	0,042	-30,64	-0,25
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-8,68	3,86	1	0,882	-21,02	3,66
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-4,84	3,40	1	>0,999	-15,72	6,04
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-2,51	2,85	1	>0,999	-11,61	6,59
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-2,96	2,88	1	>0,999	-12,17	6,25
	TCTH-auto (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-1,62	2,77	1	>0,999	-10,48	7,23
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-auto (12 meses)	0,30	0,47	1	>0,999	-1,22	1,81
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	-16,76	4,69	1	0,013	-31,76	-1,76
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-10,00	3,78	1	0,295	-22,09	2,09
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-6,16	3,32	1	>0,999	-16,76	4,44
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-3,82	2,74	1	>0,999	-12,59	4,94
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-4,28	2,78	1	>0,999	-13,16	4,60
	TCTH-auto (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-2,94	2,66	1	>0,999	-11,45	5,57
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	-17,06	4,68	1	0,010	-32,01	-2,11
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-10,30	3,77	1	0,225	-22,34	1,74
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	-6,46	3,30	1	>0,999	-17,00	4,08
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-4,12	2,72	1	>0,999	-12,81	4,56
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-4,58	2,75	1	>0,999	-13,38	4,22
	TCTH-auto (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-3,24	2,64	1	>0,999	-11,67	5,19
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	6,76	1,58	1	0,001	1,72	11,81
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	10,60	2,12	1	<0,001	3,83	17,37
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	12,94	4,89	1	0,295	-2,71	28,58
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	12,48	4,91	1	0,399	-3,23	28,19
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	13,82	4,85	1	0,158	-1,68	29,32
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	3,84	1,03	1	0,007	0,54	7,14
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	6,18	4,03	1	>0,999	-6,71	19,06
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	5,72	4,06	1	>0,999	-7,24	18,69
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	7,06	3,98	1	>0,999	-5,66	19,77
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	2,34	3,60	1	>0,999	-9,16	13,84
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	1,88	3,62	1	>0,999	-9,70	13,47
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	3,22	3,54	1	>0,999	-8,08	14,53
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-0,46	0,62	1	>0,999	-2,42	1,51
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	0,88	0,84	1	>0,999	-1,79	3,56
	TCTH-alo com DECH-C (9 meses) -	TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	1,34	0,62	1	>0,999	-0,63	3,31
%Efet ativada	TCTH-auto -	TCTH-alo sem DECH-C	-2,12	0,81	1	0,027	-4,07	-0,18
	TCTH-auto -	TCTH-alo com DECH-C	-0,86	0,51	1	0,271	-2,09	0,36
	TCTH-alo sem DECH-C -	TCTH-alo com DECH-C	1,26	0,86	1	0,433	-0,80	3,32

Comparações múltiplas de Bonferroni

Legenda: auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Em relação à subpopulação CD3⁺CD4⁺CCR7CD45RA com fenótipo direcionado para tipo de resposta Th (CXCR3 e CCR6), foi observado que a subpopulação de linf T CD3⁺CD4⁺ *naive* resposta tipo Th-2% foi em média estatisticamente maior nos pacientes TCTH-alo sem DECH-C do que nos pacientes TCTH-auto (p grupo= 0,017; Tabela 36), além disso, essa subpopulação aumentou em média a cada momento de avaliação nos três grupos (p momento< 0,001; Tabela 36) (p< 0,05; Tabela 40).

As subpopulações de linf T CD4⁺ *naive* resposta tipo Th-17% e linf T CD3⁺CD4⁺ *naive* resposta tipo Th-17% (respectivamente, p momento= 0,004; Tabela 36 e p momento= 0,004; Tabela 38) aumentaram da média aos seis meses para os demais momentos avaliados (p< 0,05; Tabela 40).

Não houve alteração entre os grupos e ao longo do tempo, nas subpopulações *naive* Th1, Th2 ou Th17 (Tabelas 37 e 39).

Tabela 36. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ de acordo com o tipo de resposta Th (Th-1, Th-2 e Th-17), com eventos de DECH-C e o tempo, para células *naive*

Variável/Momento	Grupo			P Grupo	P Momento	P Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%Naive Th-1 CD4				0,936	0,345	0,372
6 meses						
média±DP	0,12±0,11	0,15±0,17	0,14±0,13			
mediana (mín.; máx.)	0,09 (0; 0,39)	0,09 (0; 0,54)	0,1 (0; 0,5)			
9 meses						
média±DP	0,23±0,27	0,18±0,16	0,16±0,16			
mediana (mín.; máx.)	0,17 (0; 1,35)	0,14 (0; 0,55)	0,12 (0; 0,65)			
12 meses						
média±DP	0,18±0,19	0,18±0,16	0,15±0,12			
mediana (mín.; máx.)	0,14 (0,01; 0,95)	0,11 (0,03; 0,51)	0,12 (0; 0,45)			
%Naive Th-2 CD4				0,017	<0,001	0,284
6 meses						
média±DP	0,88±0,95	2,23±2,28	1,57±1,17			
mediana (mín.; máx.)	0,56 (0,07; 3,56)	1,49 (0,04; 7,04)	1,4 (0; 4,07)			
9 meses						
média±DP	1,69±1,71	3,48±3,16	1,82±1,7			
mediana (mín.; máx.)	1,32 (0,03; 7,16)	2,63 (0,02; 10,45)	1,22 (0; 6,46)			
12 meses						
média±DP	2,08±2,02	4,02±3,11	2,33±2,01			
mediana (mín.; máx.)	1,34 (0,01; 7,47)	3,05 (0,18; 10,9)	2,05 (0; 7,19)			
%Naive Th-17 CD4				0,850	0,004	0,285
6 meses						
média±DP	0,029±0,069	0,022±0,037	0,018±0,021			
mediana (mín.; máx.)	0,006 (0; 0,313)	0,008 (0; 0,134)	0,012 (0,001; 0,079)			
9 meses						
média±DP	0,075±0,149	0,04±0,055	0,061±0,153			
mediana (mín.; máx.)	0,019 (0,001; 0,71)	0,017 (0,001; 0,196)	0,009 (0,001; 0,719)			
12 meses						
média±DP	0,052±0,094	0,09±0,232	0,089±0,195			
mediana (mín.; máx.)	0,017 (0,001; 0,447)	0,033 (0,002; 1,089)	0,044 (0; 1,034)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade. Legenda:; auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; h: *helper*; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoéticas

Tabela 37. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ de acordo com o tipo de resposta Th (Th-1, Th-2 e Th-17), com eventos de DECH-C e o tempo, para células men cen

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%Mem Cen Th-1				0,372	0,846	0,661
6 meses						
média±DP	1,22±0,82	1,22±0,84	1,32±0,9			
mediana (mín.; máx.)	1,2 (0,01; 3,89)	1,07 (0,27; 2,84)	1,22 (0; 3,82)			
9 meses						
média±DP	1,57±1,2	1,11±0,65	1,51±1,03			
mediana (mín.; máx.)	1,16 (0,01; 4,91)	1,12 (0,01; 2,79)	1,14 (0,04; 3,8)			
12 meses						
média±DP	1,53±1,21	1,26±0,79	1,36±0,79			
mediana (mín.; máx.)	1,31 (0,04; 4,96)	1,11 (0,37; 3,96)	1,36 (0,06; 2,94)			
%Mem Cen Th-2				0,135	0,462	0,805
6 meses						
média±DP	1,73±1,48	1,22±0,82	1,55±1,05			
mediana (mín.; máx.)	1,17 (0,23; 5,33)	1,13 (0,12; 2,48)	1,4 (0,02; 3,75)			
9 meses						
média±DP	2,07±1,69	1,56±1,05	1,6±1,2			
mediana (mín.; máx.)	1,53 (0,23; 7,03)	1,38 (0,01; 3,71)	1,41 (0,06; 5,07)			
12 meses						
média±DP	1,9±1,51	1,37±0,76	1,48±1,05			
mediana (mín.; máx.)	1,45 (0,2; 6,37)	1,57 (0,44; 3,14)	1,36 (0,03; 4,71)			
%Mem Cen Th-17				0,231	0,768	0,098
6 meses						
média±DP	0,51±0,67	0,35±0,39	0,28±0,36			
mediana (mín.; máx.)	0,16 (0; 2,45)	0,24 (0; 1,06)	0,12 (0; 1,27)			
9 meses						
média±DP	0,56±0,63	0,23±0,25	0,43±0,64			
mediana (mín.; máx.)	0,23 (0; 2,45)	0,11 (0; 0,71)	0,09 (0; 2,24)			
12 meses						
média±DP	0,47±0,56	0,3±0,28	0,58±0,56			
mediana (mín.; máx.)	0,28 (0; 2,2)	0,17 (0; 1,05)	0,48 (0; 2,17)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: auto: autólogo; alo: alógeno; DP: desvio-padrão; h: *helper*; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Tabela 38. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ de acordo com o tipo de resposta Th (Th-1, Th-2 e Th-17), com eventos de DECH-C e o tempo, para células efet

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%Efet Th-1				0,533	0,743	0,498
6 meses						
média±DP	0,37±0,69	0,28±0,52	0,39±0,61			
mediana (mín.; máx.)	0,11 (0; 2,44)	0,09 (0,02; 1,91)	0,23 (0; 2,86)			
9 meses						
média±DP	0,44±0,68	0,49±0,55	0,35±0,42			
mediana (mín.; máx.)	0,14 (0; 2,86)	0,27 (0,07; 2,21)	0,2 (0,01; 1,65)			
12 meses						
média±DP	0,6±1,43	0,28±0,32	0,24±0,35			
mediana (mín.; máx.)	0,14 (0; 7,82)	0,14 (0,03; 1,36)	0,09 (0,01; 1,56)			
%Efet Th-2				0,280	0,302	0,665
6 meses						
média±DP	0,39±0,49	0,67±0,95	1,61±2,73			
mediana (mín.; máx.)	0,18 (0,01; 1,72)	0,38 (0,02; 3,54)	0,43 (0,1; 12,03)			
9 meses						
média±DP	1,07±1,63	1,06±0,78	1,06±1,71			
mediana (mín.; máx.)	0,63 (0,04; 6,69)	1,06 (0,15; 2,86)	0,32 (0,02; 6,78)			
12 meses						
média±DP	1,17±3,03	1,3±0,93	1,6±1,98			
mediana (mín.; máx.)	0,45 (0,03; 17,43)	1,26 (0,13; 3,14)	0,77 (0,06; 7,02)			
%Efet Th-17				0,086	0,004	0,055
6 meses						
média±DP	0,038±0,068	0,018±0,015	0,033±0,033			
mediana (mín.; máx.)	0,011 (0; 0,302)	0,012 (0,001; 0,039)	0,021 (0,001; 0,13)			
9 meses						
média±DP	0,184±0,342	0,053±0,061	0,037±0,055			
mediana (mín.; máx.)	0,055 (0; 1,298)	0,025 (0; 0,236)	0,012 (0; 0,188)			
12 meses						
média±DP	0,072±0,159	0,033±0,025	0,073±0,192			
mediana (mín.; máx.)	0,017 (0; 0,59)	0,023 (0,002; 0,085)	0,027 (0; 1,016)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: auto: autólogo; alo: alógeno; DP: desvio-padrão; h: *helper*; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoéticas

Tabela 39. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ de acordo com o tipo de resposta Th (Th-1, Th-2 e Th-17), com eventos de DECH-C e o tempo, para células men efet

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%Mem Efet Th-1				0,589	0,340	0,591
6 meses						
média±DP	3,6±4,2	2,6±1	3,1±1,8			
mediana (mín.; máx.)	2,4 (0; 19)	2,3 (1,1; 4,6)	2,8 (0; 6,5)			
9 meses						
média±DP	2,9±1,6	2,8±1,2	2,6±1,4			
mediana (mín.; máx.)	2,7 (0; 6,7)	2,8 (0,4; 5,4)	2,6 (0,7; 5,4)			
12 meses						
média±DP	3,1±1,7	3,6±2,5	2,9±1,8			
mediana (mín.; máx.)	2,7 (0,1; 8,3)	3 (0,7; 9,8)	2,3 (0,3; 8,1)			
%Mem Efet Th2				0,932	0,168	0,285
6 meses						
média±DP	1,92±1,68	1,62±1,04	2,01±1,27			
mediana (mín.; máx.)	1,49 (0,15; 6,23)	1,15 (0,58; 3,92)	1,93 (0,27; 5,45)			
9 meses						
média±DP	2,03±1,3	2,18±1,59	1,79±1,55			
mediana (mín.; máx.)	1,78 (0,16; 5,72)	1,52 (0,65; 5,93)	1,37 (0,27; 7,83)			
12 meses						
média±DP	2,3±1,59	2,29±1,25	2,55±2,14			
mediana (mín.; máx.)	1,78 (0,34; 8,29)	1,84 (0,6; 4,63)	2,06 (0,11; 9,15)			
%Mem Efet Th-17				0,079	0,197	0,083
6 meses						
média±DP	0,46±0,46	0,37±0,32	0,61±0,56			
mediana (mín.; máx.)	0,36 (0; 2,03)	0,34 (0; 1,15)	0,55 (0,01; 2,1)			
9 meses						
média±DP	0,7±0,65	0,4±0,34	0,4±0,4			
mediana (mín.; máx.)	0,66 (0; 2,7)	0,36 (0; 1,17)	0,28 (0; 1,37)			
12 meses						
média±DP	0,6±0,55	0,5±0,4	0,8±0,83			
mediana (mín.; máx.)	0,53 (0; 1,93)	0,36 (0,01; 1,4)	0,7 (0; 3,83)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: auto: autólogo; alo: alógeno; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; h: *helper*; TCTH: transplante de células-tronco hematopoéticas

Tabela 40. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3⁺CD4⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo

Variável	Comparação		Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
							Inferior	Superior
%Naive Th-2	TCTH-auto -	TCTH-alo sem DECH-C	-1,60	0,58	1	0,017	-2,99	-0,22
	TCTH-auto -	TCTH-alo com DECH-C	-0,48	0,37	1	0,579	-1,36	0,40
	TCTH-alo sem DECH-C -	TCTH-alo com DECH-C	1,12	0,61	1	0,198	-0,34	2,58
	6 meses -	9 meses	-0,61	0,20	1	0,008	-1,09	-0,12
	6 meses -	12 meses	-1,16	0,28	1	<0,001	-1,84	-0,47
	9 meses	12 meses	-0,55	0,22	1	0,041	-1,08	-0,02
%Naive Th-17	6 meses -	9 meses	-0,032	0,012	1	0,020	-0,060	-0,004
	6 meses -	12 meses	-0,055	0,019	1	0,009	-0,100	-0,011
	9 meses	12 meses	-0,023	0,017	1	0,509	-0,064	0,017
%Efet Th-17	6 meses -	9 meses	-0,050	0,017	1	0,010	-0,090	-0,009
	6 meses -	12 meses	-0,031	0,012	1	0,041	-0,061	-0,001
	9 meses	12 meses	0,019	0,017	1	0,804	-0,022	0,060

Comparações múltiplas de Bonferroni

Legenda: auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; h: *helper*; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Em relação ao tipo de resposta do linfócito T regulador, somente a subpopulação de linf T CD3⁺CD4⁺CD25⁺ foi em média estatisticamente menor aos 12 meses do que aos nove meses (p momento= 0,001; Tabela 41) (p= 0,001; Tabela 42), porém tal fato não foi acompanhado na análise desta população para CD127 e FoxP3 (p interação= 0,975; Tabela 41).

Tabela 41. Descrição das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ de acordo com o tipo de resposta reguladora (CD4⁺CD25⁺), com eventos de DECH-C e o tempo

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
%CD4CD25+				0,805	0,001	0,550
6 meses						
média±DP	2,32±1,57	2,11±0,88	2,62±1,99			
mediana (mín.; máx.)	1,92 (0,53; 7,34)	2 (0,92; 3,76)	2,34 (0,01; 10,83)			
9 meses						
média±DP	2,81±1,91	2,59±2,1	2,76±2,47			
mediana (mín.; máx.)	2,29 (0,24; 9,02)	1,7 (0,33; 8,01)	2,07 (0,16; 12,24)			
12 meses						
média±DP	2,1±1,59	2,13±1,76	1,86±1,39			
mediana (mín.; máx.)	1,63 (0,42; 7,03)	1,81 (0,61; 8,86)	1,2 (0,25; 5,67)			
%CD127lowFoxP3+				0,805	0,208	0,975
6 meses						
média±DP	0,5±0,4	0,57±0,31	0,59±0,42			
mediana (mín.; máx.)	0,39 (0,04; 1,52)	0,46 (0,13; 1,26)	0,51 (0; 1,73)			
9 meses						
média±DP	0,64±0,41	0,67±0,56	0,64±0,51			
mediana (mín.; máx.)	0,54 (0,1; 1,48)	0,52 (0,14; 2,19)	0,49 (0,08; 2,24)			
12 meses						
média±DP	0,58±0,48	0,59±0,39	0,57±0,5			
mediana (mín.; máx.)	0,46 (0,1; 2,86)	0,51 (0,09; 1,81)	0,4 (0,09; 2,18)			
%CD127lowFoxP3+ CD45ROnegNaïve ativado				0,514	0,963	0,387
6 meses						
média±DP	0,006±0,008	0,007±0,01	0,005±0,007			
mediana (mín.; máx.)	0,002 (0; 0,03)	0,004 (0; 0,034)	0,004 (0; 0,039)			
9 meses						
média±DP	0,006±0,007	0,008±0,009	0,006±0,009			
mediana (mín.; máx.)	0,003 (0; 0,03)	0,005 (0,001; 0,039)	0,003 (0; 0,043)			
12 meses						
média±DP	0,01±0,029	0,006±0,006	0,004±0,004			
mediana (mín.; máx.)	0,003 (0; 0,164)	0,004 (0,001; 0,025)	0,003 (0; 0,016)			
%CD127lowFoxP3+ CD45RO+Mem ativado				0,532	0,117	0,432
6 meses						
média±DP	0,21±0,16	0,23±0,24	0,26±0,26			
mediana (mín.; máx.)	0,18 (0,01; 0,6)	0,15 (0,03; 1,04)	0,17 (0; 1,12)			
9 meses						
média±DP	0,28±0,23	0,17±0,15	0,2±0,15			
mediana (mín.; máx.)	0,22 (0,01; 0,85)	0,15 (0,05; 0,7)	0,15 (0,01; 0,62)			
12 meses						
média±DP	0,21±0,16	0,17±0,14	0,16±0,14			
mediana (mín.; máx.)	0,19 (0; 0,86)	0,13 (0; 0,53)	0,12 (0; 0,68)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: auto: autólogo; alo: alógeno; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Tabela 42. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3⁺CD4⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
%CD4CD25+	6 meses - 9 meses	-0,395	0,203	1	0,156	-0,881	0,092
	6 meses - 12 meses	0,265	0,217	1	0,667	-0,255	0,785
	9 meses - 12 meses	0,660	0,185	1	0,001	0,216	1,104

Comparações múltiplas de Bonferroni

Legenda: auto: autólogo; alo: alógeno; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Em relação às citocinas avaliadas durante o período de seis e 12 meses pós-TCTH, na resposta Th-1 foi verificado que a IL-12 aumentou em média estatisticamente de seis para nove meses (p momento= 0,019; Tabela 43) (p= 0,015; Tabela 48), enquanto que o INF- γ diminuiu em média estatisticamente aos 12 meses em relação aos demais momentos avaliados (p momento= 0,002; Tabela 43) (p< 0,05; Tabela 48).

Tabela 43. Descrição das citocinas melhor associadas ao tipo de resposta Th-1

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
IL-12				0,080	0,019	0,382
6 meses						
média±DP	116,5±102,7	99,4±103,3	106,2±113,1			
mediana (mín.; máx.)	121,8 (0,9; 347)	95,5 (1,5; 371)	121,8 (0,1; 554)			
9 meses						
média±DP	186±142	169,6±164	351,5±1074,5			
mediana (mín.; máx.)	162,8 (1,5; 606)	145 (1,8; 614,9)	130,7 (3,4; 6189)			
12 meses						
média±DP	101,9±130,9	74±117,8	198,7±405,5			
mediana (mín.; máx.)	32,9 (0,9; 472)	17,1 (0,9; 518)	129,3 (0,8; 2182)			
INFY				0,088	0,002	0,619
6 meses						
média±DP	4755,1±3573,8	6652,7±6167,7	5095,2±3120,8			
mediana (mín.; máx.)	3722 (2,6; 11906)	6327 (558; 30149)	3677 (1307; 10012)			
9 meses						
média±DP	4619,5±3634,2	6672±4213,7	5065,3±3656,1			
mediana (mín.; máx.)	2825,5 (423; 11401)	6169 (575,4; 17639)	3468 (76,8; 12167)			
12 meses						
média±DP	2798,3±3397,6	3613,7±3977,4	4392,4±4392,5			
mediana (mín.; máx.)	1627,5 (0,3; 10121)	2060 (8,6; 9692)	3696 (1,7; 12433)			
TNFα				0,446	0,063	0,078
6 meses						
média±DP	2605,8±1886,6	2584±1716,6	2530±1478,9			
mediana (mín.; máx.)	1960,5 (253,1; 6383)	2461 (658,2; 7138)	2369,5 (303,8; 4765)			
9 meses						
média±DP	4523,8±6830,4	3268,1±2109,8	3038,5±1805,7			
mediana (mín.; máx.)	4056,5 (354,4; 40276)	3357 (5,1; 8834)	3788 (69,4; 7565)			
12 meses						
média±DP	1711,7±1816,6	1657,1±1947,3	3849,4±7503			
mediana (mín.; máx.)	1090,5 (1,1; 4976)	607,5 (1; 4612)	3187 (1,3; 40922)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda:auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; h: *helper*; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Na resposta Th-2, a IL-5 apresentou comportamento semelhante ao INF- γ (p momento < 0,001; Tabela 44) (p< 0,05; Tabela 48). A IL-4 diminuiu na avaliação de nove para 12 meses (p= 0,008), nos três grupos avaliados (p momento= 0,008; Tabelas 44 e 48).

Tabela 44. Descrição das citocinas melhor associadas ao tipo de resposta Th-2

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
IL-4				0,261	0,008	0,563
6 meses						
média±DP	24,4±18,4	18,5±17,3	19,8±15,7			
mediana (mín.; máx.)	29,6 (0,1; 60)	24 (0; 52,3)	25,6 (0; 44)			
9 meses						
média±DP	28,9±17,4	22,5±14,8	21,5±14,2			
mediana (mín.; máx.)	31,7 (0; 68)	28,9 (0,4; 43)	25,2 (0,5; 42)			
12 meses						
média±DP	16±18,6	13,5±16,5	18,9±17,5			
mediana (mín.; máx.)	2,1 (0,2; 57)	2,9 (0,2; 52)	27,3 (0,2; 60)			
IL-5				0,998	<0,001	0,919
6 meses						
média±DP	1023±533,3	1040,1±536,3	1008,5±491,1			
mediana (mín.; máx.)	1276 (14,2; 1774)	1296 (226,1; 1852)	1171 (115; 1648)			
9 meses						
média±DP	1180,8±426,9	1157±497,5	1082,7±472,8			
mediana (mín.; máx.)	1383 (181,1; 1681)	1405 (6,7; 1690)	1189,5 (4,9; 1755)			
12 meses						
média±DP	650,7±680,7	664,7±710,8	751,8±683,9			
mediana (mín.; máx.)	387,1 (0,8; 1985)	377,1 (0,8; 1664)	646,1 (0,8; 1803)			
IL-13				0,416	0,059	0,527
6 meses						
média±DP	147,5±116,1	142,4±143,9	207,8±402,1			
mediana (mín.; máx.)	138 (1,3; 373,4)	104 (0,1; 442)	157 (0,1; 2321,8)			
9 meses						
média±DP	168,8±112,5	240,7±281,8	164,2±116,8			
mediana (mín.; máx.)	139,5 (0,3; 409)	231,3 (0,8; 1311)	170 (1; 504)			
12 meses						
média±DP	106,6±111	124,5±129,1	148,8±166,1			
mediana (mín.; máx.)	50,5 (0,3; 300,7)	50,8 (0,2; 300,7)	120 (0,3; 741,6)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda; auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; h: *helper*; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Na resposta Th-17, tanto a IL-6 quanto a IL-17 foram em média menores aos 12 meses do que aos nove meses ($p=0,012$ e $p=0,021$, respectivamente; Tabela 48) (p momento $<0,005$; Tabela 45).

Tabela 45. Descrição das citocinas melhor associadas ao tipo de resposta Th-17

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
IL-6				0,648	0,015	0,260
6 meses						
média±DP	146,1±254,6	92,3±89,4	97,3±84,1			
mediana (mín.; máx.)	136,5 (0,2; 1557,1)	89,5 (0,1; 268,5)	120,8 (0; 321,2)			
9 meses						
média±DP	157,4±84,7	172±162,5	150,8±101,9			
mediana (mín.; máx.)	160,5 (0; 352,6)	164 (1,1; 731,1)	168,1 (1,2; 356)			
12 meses						
média±DP	77,4±87,4	59,2±69,1	130,2±238,1			
mediana (mín.; máx.)	14,9 (0,7; 298)	10,7 (1,1; 178,9)	55,7 (1,2; 1266)			
IL-17				0,872	0,024	0,468
6 meses						
média±DP	140,6±142,9	144,5±197,3	131,9±144,5			
mediana (mín.; máx.)	114,5 (0,01; 531,9)	101 (0,01; 712)	130,5 (0,01; 510,6)			
9 meses						
média±DP	222,3±245,7	174,3±137,1	153,7±123,6			
mediana (mín.; máx.)	158,8 (0,01; 1390)	201 (0,01; 415,4)	159,5 (0,01; 435,4)			
12 meses						
média±DP	91,6±119,9	105,8±139,1	135,9±142,2			
mediana (mín.; máx.)	7,9 (0,01; 440,5)	6 (0,01; 392,7)	105 (0,01; 491,8)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas; auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; h: *helper*

Na resposta T reguladora, a IL-2, embora tenha apresentado interação entre os grupos (p interação = 0,020 e p grupo = 0,003; Tabela 46) não foi possível identificar entre quais grupos e momentos ocorreram diferenças ($p > 0,05$; Tabela 48). O TGF- β 1 diminuiu em média estatisticamente de seis para nove meses em todos os três grupos (p momento = 0,046; Tabela 46) ($p = 0,039$; Tabela 48).

Tabela 46. Descrição das citocinas melhor associadas ao tipo de resposta T reguladora

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
IL-2				0,003	0,188	0,020
6 meses						
média±DP	40,5±139,5	6,5±8,7	6,8±8,9			
mediana (mín.; máx.)	10 (0; 710,1)	2,5 (0; 31)	2,9 (0; 35,7)			
9 meses						
média±DP	12±15,6	8,2±9,3	78,4±292,5			
mediana (mín.; máx.)	10,2 (0; 82,2)	5,7 (0; 39)	8,5 (0; 1515)			
12 meses						
média±DP	8,9±11,1	5,6±7,2	25,5±55,6			
mediana (mín.; máx.)	3,8 (0; 39,9)	2,7 (0; 23,9)	5,8 (0; 216,5)			
TGFb1 (TREG)				0,969	0,046	0,113
6 meses						
média±DP	80048±107980,7	57944±62326,1	82777,2±97376,9			
mediana (mín.; máx.)	34838,5 (1,5; 408654)	34060 (820,8; 223943)	37179,5 (35; 306395)			
9 meses						
média±DP	42818,6±62670,8	42670,5±40164,6	58061,2±77749,2			
mediana (mín.; máx.)	22359,5 (38,2; 313943)	29269 (3429; 157663)	36803 (345,2; 303595)			
12 meses						
média±DP	56320,5±61394,4	69389,3±97117,4	36024,2±31205,2			
mediana (mín.; máx.)	40504 (820,8; 253116)	29091 (290,3; 325075)	27726 (0; 134301)			
TGFb2 (TREG)				0,658	0,184	0,304
6 meses						
média±DP	11976,2±11784,7	21843,9±49745,3	12578,5±10201,6			
mediana (mín.; máx.)	6463,5 (7,6; 34018)	6848 (409,9; 245811)	8420,5 (5,4; 30858)			
9 meses						
média±DP	7510,7±7331,8	9495,7±8445,7	11054,4±8653,1			
mediana (mín.; máx.)	5086 (13,2; 29550)	6998 (1110; 31194)	6481 (377; 26806)			
12 meses						
média±DP	13421,9±49367,1	9402±10264,9	6193±7330,8			
mediana (mín.; máx.)	2911 (78,8; 286005)	3966 (204,5; 31194)	3499 (0,1; 24582)			
TGFb3 (TREG)				0,432	0,998	0,657
6 meses						
média±DP	3175,4±4129,5	3120,9±3316,8	3574,6±4157			
mediana (mín.; máx.)	1335 (9,1; 15261)	2014 (19,1; 11148)	1676,5 (0; 14147)			
9 meses						
média±DP	2397±2970,7	2857,9±2743,1	4486,1±9459,4			
mediana (mín.; máx.)	1250 (14,6; 11641)	1928 (291,8; 9685)	1885 (0,1; 53383)			
12 meses						
média±DP	3456,1±3134,1	3114,7±2769,7	3301±3021			
mediana (mín.; máx.)	2640 (14,6; 12695)	2171,5 (44,9; 8978)	2014 (3,9; 10909)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

Na resposta da citocina mais ligada às atividades do macrófago (GM-CSF), houve uma diminuição em média dos seis meses para os demais momentos, independente do grupo de pacientes (p momento < 0,001; Tabela 47) (p< 0,05; Tabela 48). Em relação à IL-10, não houve diferenças identificáveis, seja pelo decorrer do tempo (p momento= 0,222) ou entre os grupos (p grupo= 0,310).

Tabela 47. Descrição das citocinas melhor associada ao macrófago (GM-CSF) ou relacionadas às respostas Th (IL-10) e T reg

Variável/Momento	Grupo			p Grupo	p Momento	p Interação
	TCTH-auto	TCTH-alo sem DECH-C	TCTH-alo com DECH-C			
GM-CSF (CSF1)				0,073	<0,001	0,209
6 meses						
média±DP	3935,6±14644,7	1261,3±1273,8	1176,7±1905,3			
mediana (mín.; máx.)	505,5 (102; 83829)	625,4 (111; 4168)	584,7 (80; 9039)			
9 meses						
média±DP	762±1001,4	632,9±388,7	504,9±415,4			
mediana (mín.; máx.)	520,5 (89; 4509)	520,5 (24; 1472)	462,3 (14,6; 1677)			
12 meses						
média±DP	329,8±421,4	354,6±532,4	400,8±441,8			
mediana (mín.; máx.)	162 (2,2; 1600)	129 (0,3; 2223)	218,9 (0,7; 1641)			
IL-10				0,310	0,222	0,210
6 meses						
média±DP	211,1±188,1	166,9±167,2	216,6±182			
mediana (mín.; máx.)	221,6 (0,4; 683)	131,6 (0; 483)	237,5 (1; 537,8)			
9 meses						
média±DP	260,3±166,6	290±421,1	247,9±211,9			
mediana (mín.; máx.)	287 (0; 636)	244 (0,1; 2016)	232,1 (0,9; 885)			
12 meses						
média±DP	145,1±155,9	181,3±178,5	328,5±611,4			
mediana (mín.; máx.)	60,4 (1,5; 414,7)	152,3 (1,3; 442,5)	306,2 (1; 3323)			

EEG com distribuição gama e função de ligação identidade

Legenda: TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas; auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo

Tabela 48. Resultado das comparações múltiplas nas subpopulações de linf T CD3⁺CD4⁺ em relação aos grupos (auto e alo) e ao tempo

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
IL-12	6 meses - 9 meses	-128,33	45,66	1	0,015	-237,64	-19,02
	6 meses - 12 meses	-17,49	29,55	1	>0,999	-88,24	53,26
	9 meses - 12 meses	110,84	47,96	1	0,063	-3,99	225,67
INF-Y	6 meses - 9 meses	67,90	729,14	1	>0,999	-1677,66	1813,45
	6 meses - 12 meses	1890,01	644,38	1	0,010	347,38	3432,64
	9 meses - 12 meses	1822,11	629,98	1	0,011	313,95	3330,28
IL-4	6 meses - 9 meses	-3,35	2,87	1	0,730	-10,23	3,53
	6 meses - 12 meses	4,72	2,46	1	0,165	-1,17	10,62
	9 meses - 12 meses	8,07	2,69	1	0,008	1,64	14,51
IL-5	6 meses - 9 meses	-116,27	113,95	1	0,923	-389,06	156,51
	6 meses - 12 meses	334,71	91,77	1	0,001	115,03	554,40
	9 meses - 12 meses	450,99	101,17	1	<0,001	208,79	693,19
IL-6	6 meses - 9 meses	-48,37	26,01	1	0,189	-110,64	13,89
	6 meses - 12 meses	23,28	18,56	1	0,629	-21,15	67,72
	9 meses - 12 meses	71,65	24,91	1	0,012	12,02	131,29
Th-17	6 meses - 9 meses	-45,08	28,54	1	0,342	-113,40	23,24
	6 meses - 12 meses	27,93	21,55	1	0,585	-23,67	79,53
	9 meses - 12 meses	73,01	27,06	1	0,021	8,23	137,79
IL-2	TCTH-auto (6 meses) - TCTH-auto (9 meses)	28,65	15,46	1	>0,999	-20,76	78,06
	TCTH-auto (6 meses) - TCTH-auto (12 meses)	31,49	15,45	1	>0,999	-17,89	80,87
	TCTH-auto (6 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	34,03	15,35	1	0,958	-15,04	83,09
	TCTH-auto (6 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	32,37	15,56	1	>0,999	-17,37	82,12
	TCTH-auto (6 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	34,92	15,29	1	0,807	-13,97	83,81
	TCTH-auto (6 meses) - TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	33,74	15,28	1	0,981	-15,12	82,60
	TCTH-auto (6 meses) - TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-37,81	34,32	1	>0,999	-147,53	71,90
	TCTH-auto (6 meses) - TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	15,40	18,39	1	>0,999	-43,40	74,19
	TCTH-auto (9 meses) - TCTH-auto (12 meses)	2,85	5,69	1	>0,999	-15,34	21,03
	TCTH-auto (9 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	5,38	5,56	1	>0,999	-12,41	23,17
	TCTH-auto (9 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	3,72	6,13	1	>0,999	-15,87	23,32
	TCTH-auto (9 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	6,27	5,41	1	>0,999	-11,03	23,57
	TCTH-auto (9 meses) - TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	5,09	5,38	1	>0,999	-12,12	22,31
	TCTH-auto (9 meses) - TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-66,46	31,20	1	>0,999	-166,19	33,27
	TCTH-auto (9 meses) - TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-13,25	11,56	1	>0,999	-50,21	23,71
	TCTH-auto (12 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (6 meses)	2,53	4,66	1	>0,999	-12,37	17,44
	TCTH-auto (12 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	0,88	5,32	1	>0,999	-16,14	17,90
	TCTH-auto (12 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	3,42	4,48	1	>0,999	-10,90	17,75
	TCTH-auto (12 meses) - TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	2,25	4,45	1	>0,999	-11,97	16,47
	TCTH-auto (12 meses) - TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-69,31	31,05	1	0,922	-168,57	29,95
	TCTH-auto (12 meses) - TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-16,10	11,16	1	>0,999	-51,76	19,57
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (9 meses)	-1,66	4,82	1	>0,999	-17,07	13,76
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	0,89	4,06	1	>0,999	-12,08	13,86
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) - TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-0,29	4,03	1	>0,999	-13,17	12,60
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) - TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-71,84	30,99	1	0,736	-170,92	27,24
	TCTH-alo sem DECH-C (6 meses) - TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-18,63	11,00	1	>0,999	-53,79	16,53
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) - TCTH-alo sem DECH-C (12 meses)	2,55	4,66	1	>0,999	-12,36	17,45
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) - TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	1,37	4,78	1	>0,999	-13,90	16,65
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) - TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-70,18	31,10	1	0,865	-169,60	29,23
	TCTH-alo sem DECH-C (9 meses) - TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-16,97	11,29	1	>0,999	-53,08	19,13
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) - TCTH-alo com DECH-C (6 meses)	-1,18	3,82	1	>0,999	-13,37	11,02
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) - TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-72,73	30,96	1	0,678	-171,72	26,26
	TCTH-alo sem DECH-C (12 meses) - TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-19,52	10,92	1	>0,999	-54,43	15,39
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) - TCTH-alo com DECH-C (9 meses)	-71,55	30,78	1	0,723	-169,96	26,85
	TCTH-alo com DECH-C (6 meses) - TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	-18,34	10,90	1	>0,999	-53,18	16,49
	TCTH-alo com DECH-C (9 meses) - TCTH-alo com DECH-C (12 meses)	53,21	31,98	1	>0,999	-49,04	155,46
TGF- β 1	6 meses - 9 meses	24824,5	9988,9	1	0,039	911,3	48737,6
	6 meses - 12 meses	20312,0	11815,6	1	0,257	-7974,2	48598,2
	9 meses - 12 meses	-4512,5	8952,0	1	>0,999	-25943,4	16918,4
GM-CSF (CSF1)	6 meses - 9 meses	1493,40	453,58	1	0,003	407,53	2579,26
	6 meses - 12 meses	1762,67	446,51	1	<0,001	693,75	2831,60
	9 meses - 12 meses	269,28	143,56	1	0,182	-74,41	612,97

Comparações múltiplas de Bonferroni

Legenda:; auto: autólogo; alo: alogênico; DP: desvio-padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo; h: *helper*; TCTH: transplante de células-tronco hematopoieticas

5 DISCUSSÃO

A DECH-C envolve a interação de linfócitos T e B alorreativos e células da resposta imune inata como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos.

O processo da DECH-C inicia logo após o TCTH, com o regime de condicionamento e a ativação dos linfócitos T do doador. A injúria tecidual e a ativação das células do endotélio vascular provocam a migração das células do sistema imune do doador para a área lesada. No timo, os linf T CD8⁺ provocam dano à célula epitelial tímica o que causa a liberação de linf T CD4⁺ autorreativos devido à falha no mecanismo natural de seleção negativa para esses linfócitos⁽⁷⁶⁾.

O timo tem um papel central no início do processo de DECH-C, pois o grau de dano tecidual e a capacidade de regeneração estarão interligados com o desenvolvimento de DECH-C, afinal é desse órgão que emergirá o compartimento linfoide T, caracterizado por suas subpopulações e produção de citocinas, as quais estarão envolvidas tanto na fisiopatologia da DECH quanto na recuperação da resposta adaptativa.

A recuperação do sistema imune adaptativo é lenta e representa um reflexo da capacidade de regeneração das funções do timo. Durante a sua recuperação, o paciente se torna suscetível aos mais variados tipos de infecção, cujos agentes mais prevalentes surgem em acordo com a recuperação do sistema imunológico ao longo do tempo.

A capacidade de regeneração do timo pode ser um reflexo de como esse órgão estava antes mesmo da realização do TCTH. Existem vários fatores que podem afetar as funções do timo ao longo da vida, mas o principal parece ser o envelhecimento.

No geral, a timopoiese está completa aos 30 anos de idade. Os indivíduos mais velhos (≥ 70 anos) têm em média 10% do espaço epitelial tímico, no entanto a capacidade de produzir células T ainda continua, muito embora significativamente reduzida. O *pool* de células T permanece semelhante no sangue periférico devido à compensação homeostática com linfócitos T periféricos, mas a capacidade do timo de responder prontamente a uma queda brusca da contagem T periférica se torna bastante prejudicada com o avançar da idade⁽⁷⁷⁾.

Em uma coorte de 532 indivíduos saudáveis, o número de $\alpha 1$ -círculos (TREC 89- Kb) permaneceu estável até cerca de dez a 15 anos de idade, quando ocorreu uma queda brusca de cerca de 1-1,5 log até 20-25 anos de idade e após permaneceu com descenso constante em torno de 0,03 logs/ano e uma proporção de ± 2 logs a cada 10 anos⁽⁷⁸⁾.

A atrofia tímica não é um fator exclusivo do envelhecimento. Existem outros fatores que também podem influenciar como presença de timoma, estados inflamatórios,

situações psicológicas ou físicas de estresse, exercício intenso, condições ambientais desfavoráveis, exposição a substâncias tóxicas, trauma e medicamentos. No entanto, a maioria desses fatores segue um processo autolimitado e reversível⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾. Em relação ao TCTH, a função tímica diminuída após o procedimento também tem sido relacionada a aumento da morbimortalidade⁽⁷⁹⁻⁸³⁾.

Baseado nesses relatos, o nosso estudo selecionou pacientes entre 18 e 60 anos para obter uma maior amplitude de idade com a menor diferença possível na função tímica entre seus extremos. Além disso, para melhor caracterizar a influência da idade, o presente estudo comparou os pacientes com indivíduos saudáveis pareados em idade e sexo.

Na nossa casuística (n= 172), foi possível observar que os pacientes (n= 111) apresentaram mediana de sjTREC menor que os indivíduos saudáveis (n= 54), independente do grupo etário. Em ambos ocorreu um descenso gradual do sjTREC à medida que a idade avançou, sendo mais significativo entre os indivíduos saudáveis. Inclusive, deve ser destacado que a mediana de sjTREC dos pacientes foi menor do que a mediana dos indivíduos saudáveis mais velhos (≥ 50 anos). A mediana dos pacientes sempre se manteve inferior à dos indivíduos saudáveis, mesmo quando os pacientes foram separados por grupos relacionados à doença.

Ao ser estabelecido um ponto de corte baseado na mediana de indivíduos saudáveis, nós encontramos duas condições independentes relacionadas fortemente à função tímica diminuída (valores de sjTREC abaixo da mediana de 607 cópias/ μ g de DNA) que foram a idade e o fato de ser paciente. Particularmente, o fator “paciente” está relacionado com a doença hematológica prévia e seu tratamento o que, provavelmente, também influenciou para a deterioração da função do timo, além do decorrer dos anos.

O fato do grupo de pacientes não ter apresentado um descenso semelhante aos indivíduos saudáveis e de ter havido pouca diferença entre as medianas de sjTREC nos pacientes em relação aos grupos etários e aos grupos de doenças fortaleceu a suposição de que a doença hematológica e/ou seu(s) tratamento(s) prévio(s) foram condições determinantes para que o paciente já se apresentasse como candidato ao TCTH com uma função tímica deteriorada não somente pela idade.

Alguns estudos relatam que o envelhecimento está relacionado com função tímica diminuída, ou seja, que o avançar da idade apresenta uma relação inversa com a quantificação de sjTREC. Steffens e cols, ao estudarem o impacto da idade na função tímica em crianças recém-nascidas até cinco anos de idade e em indivíduos de 23 a 58 anos, encontraram relação inversa entre cjTREC e a idade em ambos os grupos⁽⁸⁴⁾.

Resultados semelhantes foram observados por Geenen e cols no estudo de sjTREC em 41 indivíduos com idade entre um e 83 anos⁽⁸⁵⁾. Esses dados também foram corroborados por Naylor e cols, estudo no qual evoluiu uma coorte que variou entre 18 e 90 anos de idade e análise de sjTREC em linf T CD4⁽⁸⁶⁾.

Em uma coorte de 172 indivíduos com variação entre 16 e 65 anos de idade, Cho e cols encontram correlação negativa entre sjTREC e o avançar da idade⁽⁸⁷⁾. Serana e cols avaliaram sjTREC em células mononucleares (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) de 37 indivíduos com imunodeficiência variável comum e compararam com 78 indivíduos saudáveis, doadores de sangue. Eles encontraram um decréscimo na quantificação de sjTREC com o passar da idade, sendo que o sexo feminino apresentou níveis mais altos do que os indivíduos do sexo masculino⁽⁸⁸⁾.

Em nosso estudo, não houve diferença no declínio de sjTREC entre os sexos. Nós também não encontramos diferença significativa entre os pacientes que foram submetidos ao TCTH-alo em relação ao TCTH-auto. No entanto, mais especificamente, a mediana de sjTREC foi mais alta entre os pacientes com doença mielóide do que em pacientes com diagnóstico de MM, porém a média de idade foi mais alta entre os pacientes com MM e tal situação pode ter provocado o declínio na quantificação de sjTREC.

A diferença de medianas de sjTREC dos pacientes em relação aos indivíduos saudáveis sugere que a condição do paciente provocou essa situação; a queda mais acentuada de sjTREC com o avançar da idade entre os indivíduos saudáveis sugere que o envelhecimento provocou essa situação; a quase estabilização na mediana de sjTREC entre os pacientes quando relacionado à idade sugeriu que sua condição clínica, independente do tipo de doença prévia ou do tratamento empregado e sim pelo fato de ter estado doente e ter recebido um tratado intenso foram os determinantes para função tímica diminuída. No entanto, a diferença encontrada entre os doentes com diagnóstico prévio de doença mielóide e os pacientes com MM sugeriu que apesar das respectivas doenças e de seus tratamentos prévios, a idade ainda pôde apresentar influência na função tímica.

Douek e cols estudaram a relação entre a idade e sjTREC/cjTREC em PBMCs desde o recém-nascido até os 73 anos de idade e compararam os achados com pacientes submetidos à timectomia e com indivíduos infectados pelo HIV ainda em estágio inicial da doença. O número de TRECs apresentou decréscimo com o avançar da idade em todos os grupos, mas com melhora nos indivíduos HIV⁺ após a introdução da terapia antirretroviral⁽⁸⁹⁾.

O sjTREC também foi estudado em relação ao transplante cardíaco. A relação negativa entre a quantificação de sjTREC em indivíduos saudáveis (n= 66) e pacientes

transplantados (n= 27) foi observada, sendo que os pacientes submetidos ao transplante apresentaram mediana de sjTREC inferior aos indivíduos saudáveis⁽⁹⁰⁾. Em outro estudo, o sjTREC foi avaliado em 149 amostras de indivíduos que apresentaram reações adversas a drogas (anafilaxia, urticária, eosinofilia e sintomas sistêmicos) e os achados foram comparados com uma coorte prévia de 172 indivíduos saudáveis. A mediana de sjTREC entre os indivíduos com alteração do estado imunológico foi menor do que em indivíduos saudáveis⁽⁹¹⁾.

Outros estudos têm relacionado função tímica enfraquecida ao tratamento de doenças hematológicas. Svaldi e cols quantificaram sjTREC em 25 pacientes com MM cujas amostras foram coletadas entre o primeiro e o segundo TCTH. Eles encontraram correlação entre os níveis de cjTREC e a idade; pacientes mais jovens do que 50 anos de idade apresentaram níveis de cjTREC mais alto do que indivíduos mais velhos. Além do que o TCTH propiciou um acentuado decréscimo na quantificação de cjTREC até um ano após o procedimento⁽⁸¹⁾. Li e cols estudaram sjTREC em 88 pacientes com diagnóstico de LMA não tratada até aquele momento e compararam com 38 indivíduos saudáveis e outros dez pacientes em remissão completa da LMA. O número de cópias sjTREC dos pacientes já tratados não diferiu dos indivíduos saudáveis, porém os pacientes ainda não tratados apresentaram níveis de sjTREC inferiores aos indivíduos saudáveis, mesmo após o ajuste da idade. Além disso, após estratificação pela idade de 40 anos, os pacientes mais jovens (<40 anos) apresentaram níveis de sjTREC maiores do que os indivíduos mais velhos (≥ 40 anos), no entanto essa diferença não foi encontrada entre os indivíduos saudáveis⁽⁹²⁾.

Sun e cols analisaram sjTREC em 134 pacientes com diagnóstico de DH ou LNH com idade entre 18 e 67 anos. Além disso, foram feitas análises seriadas do tamanho do timo por meio de tomografia computadorizada nesses pacientes. Em 28,4% deles ocorreu hiperplasia da glândula, por outro lado, os níveis de sjTREC diminuíram após o tratamento quimioterápico e, somente após seis meses, os pacientes apresentaram níveis semelhantes ao pré-tratamento⁽⁹³⁾. Haining e cols estudaram sjTREC em linf T CD3⁺ em 73 crianças com diagnóstico recente de LLA com variação entre um e 17 anos de idade, sendo que a média de idade apresentou componente bimodal, isto é, o primeiro pico aos quatro anos e um segundo aos 15 anos. Esse grupo foi comparado com outro grupo de 805 crianças saudáveis com idade variável entre recém-nascido até 18 anos. Os níveis de sjTREC foram significativamente menores nos pacientes e, mesmo após dois anos de tratamento, 86% dos valores de sjTREC estavam abaixo do percentil 10 dos indivíduos

saudáveis. A mediana de sjTREC dos pacientes tratados para LLA foi semelhante a mediana de indivíduos aos 49 anos, que serviram como controle para o estudo. Os autores sugeriram que a timopoiese é acentuadamente reduzida em pacientes com doença hematológica ativa ou mesmo após seu tratamento⁽⁹⁴⁾.

Na literatura em geral, algumas condições são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de DECH (-A e/ou -C)⁽⁹⁵⁻¹⁰⁹⁾. No presente estudo, arbitrariamente, algumas dessas condições já conhecidas também foram avaliadas como fatores de risco para o advento de DECH-C, juntamente com a função tímica. A função tímica enfraquecida, isto é, sjTREC abaixo de 607 cópias/ μ g de DNA foi a única condição que se apresentou como fator de risco para o desenvolvimento de DECH-C, no entanto, deve ser ressaltado que o RR não foi possível estimar devido ao baixo número de casos que tinham sjTREC em valores altos.

Além disso, a condição da função tímica (valores baixos versus valores altos) foi avaliada não somente em relação à incidência cumulativa para o evento de interesse DECH-C, mas também para DECH-A de maior gravidade (graus III e IV), já que eventos de DECH-A estão fortemente relacionados com futuros eventos de DECH-C⁽⁹⁶⁾. Os resultados do nosso estudo evidenciaram que a taxa de incidência cumulativa para os dois eventos, com óbitos e recaídas como fatores competitivos, foram conflitantes. A taxa de incidência cumulativa para eventos de DECH-C foi significativamente maior entre os pacientes que tinham função tímica diminuída, no entanto, ocorreu o oposto para evento de DECH-A (graus III-IV). Resultados semelhantes foram corroborados por Clave e cols para DECH-C, mas encontraram taxa de incidência cumulativa aumentada também para DECH-A. Talvez essa discrepância entre resultados tenha ocorrido pela definição de diferentes pontos de corte, no qual no nosso estudo foi considerada a mediana dos indivíduos saudáveis enquanto que no estudo de Clave e cols foi baseado no percentil 60 da curva de sobrevida dos doentes⁽¹¹⁰⁾.

A despeito da profilaxia empregada, muitos pacientes sofrem com a DECH. No Hospital Amaral Carvalho, a incidência de DECH-A (II-IV) ao fim do primeiro ano de TCTH dos pacientes foi de 25,3% (19/75), sendo de 10,7% (8/75) para os graus III-IV, enquanto que a incidência de DECH-C foi de 49,3% (37/75). A taxa de incidência ocorreu de acordo com a literatura^(112, 113).

O regime de profilaxia mais empregado mundialmente é a associação de um inibidor da calcineurina (CSA ou tacrolimus) com um agente citostático (MTX) de curto curso de tempo de ação. Esse regime foi inicialmente empregado em 1986 e, desde então, nenhuma profilaxia com o emprego de um único agente imunossupressor foi superior na

prevenção para DECH-A⁽¹¹³⁻¹¹⁷⁾. No Hospital Amaral Carvalho não é diferente, a associação CSA + MTX foi a mais empregada, na presente casuística ela foi administrada em 81,3% dos casos (61/75). Na análise dos fatores de risco para DECH-C, foi incluída a profilaxia para DECH-A exatamente porque a DECH-A é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de DECH-C, mas a associação com CSA não se apresentou como fator de risco neste estudo, seja na associação com MTX ou seja na associação com outras drogas, no caso MMF ou metilprednisolona. No entanto, deve ser ressaltado que o emprego dos inibidores de calcineurina podem enfraquecer os mecanismos de tolerância periférica através da supressão dos linfócitos T reg⁽¹¹⁸⁾.

Após o TCTH, os pacientes sofrem uma fase de aplasia caracterizada por intensa neutropenia (< 500 neutrófilos/mm³), a qual é denominada de fase da pré-enxertia medular. No Hospital Amaral Carvalho, é considerada enxertia medular após três dias consecutivos de contagem de neutrófilos ≥ 500 células/mm³. A dose total de células nucleadas e de células CD34⁺ como fontes de enxerto são fatores importantes que contribuem para o tempo até a enxertia medular. No presente estudo, a média de células CD34⁺ foi de 6×10^6 /kg enquanto que a média de células nucleadas foi de 3×10^8 /kg. A média de enxertia, sendo a fonte de células a CTP, foi de 12 dias enquanto a fonte celular por meio da medula óssea foi responsável por uma média de 17 dias, algo compatível com dados da literatura que consideram médias de enxertia por CTP e por MO de 14 e 21, respectivamente⁽¹¹⁹⁾.

Em relação ao tempo de enxertia, considerada por nós como tardia quando mediana ≥ 14 dias, não se apresentou como um fator de risco para DECH-C. Inclusive, independente do tempo de enxertia, a recuperação da função tímica foi semelhante entre aqueles com enxertia tardia e aqueles com a mais precoce, independente do tipo de TCTH (-alo ou -auto).

O sucesso da enxertia requer a criação de um espaço na medula óssea para a efetiva acomodação das células-tronco hematopoiéticas e eliminação das células imunes do receptor e, assim, evitar a rejeição ao enxerto, situação na qual é dependente não só das células-tronco hematopoiéticas envolvidas, mas também do regime de condicionamento empregado.

Tipicamente, o regime para o condicionamento da medula óssea utiliza drogas quimioterápicas citorredutoras tais como ciclofosfamida e busulfano, irradiação corporal total (sigla em inglês, TBI) e/ou emprego de anticorpos como o alemtuzumab ou globulina antitimócito (ATG). Não existem critérios padronizados para a escolha do regime de condicionamento, a prática clínica é bastante variada entre os países e,

inclusive, entre as instituições de um mesmo país. De um modo geral, o regime é baseado em julgamentos clínicos que consideram as comorbidades do paciente, a doença, o doador e a fonte de células⁽¹²⁰⁾.

No presente trabalho, 66,7% dos pacientes submetidos ao TCTH-alo receberam regime de condicionamento MAC e as seguintes drogas foram envolvidas: ciclofosfamida, bussulfano, fludarabina, etoposide e/ou ATG, além da TBI. Em relação especificamente à ATG, entre os 75 pacientes submetidos ao TCTH-alo, 38 pacientes apresentaram DECH-C (50,6%; 38/75), sendo que sete receberam ATG (18,4%; 7/38) entre os que desenvolveram DECH-C. Entre esses sete pacientes, houve três óbitos (42,8%; 3/7). Em relação aos pacientes que não apresentaram DECH-C (49,3%; 37/75), 11 deles receberam ATG (29,7%; 11/37). Entre esses 11 pacientes, houve quatro óbitos (36,4%; 4/11).

A ATG exerce função imunossupressiva principalmente por meio da depleção dos linfócitos T por ligação direta aos epítomos da superfície do linfócito seguido de lise celular por ativação do sistema complemento; seus efeitos podem persistir por semanas e atuar contra os linfócitos T infundidos com o enxerto⁽¹²¹⁻¹²³⁾.

Além disso, a ATG também provoca apoptose dos linfócitos B, modulação das moléculas de superfície que medeiam a interação entre leucócito e endotélio, interferência na maturação e migração das células dendríticas e indução na proliferação das células T NK e de linf T reg, especificamente $CD4^+CD25^{high}Foxp3^{+}$ ^(124, 125). Em um ensaio com linf T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ex-vivo, de sangue periférico de doador voluntário, foi notado um aumento significativo dessa população à custa da conversão de células $CD4^+CD25^{neg}$ para $CD4^+CD25^+$, sugerindo existir um mecanismo de expansão dos linfócitos T reg pela ação da ATG⁽¹²⁵⁾.

Uma revisão sistemática com meta-análise que envolveu 875 pacientes encontrou significativa menor incidência de DECH-A e -C nos pacientes que receberam ATG em relação a quem não a recebeu, no entanto sem impacto significativo na SG⁽¹²⁶⁾. No entanto, os resultados ainda são conflitantes em relação ao real benefício da ATG, pois existem ensaios clínicos randomizados que evidenciam o benefício da ATG enquanto outros não^(103, 127, 128).

Em relação especificamente à ATG e a quantificação de sjTREC, no nosso estudo não houve diferença na recuperação das funções do timo entre o grupo que recebeu ATG e o grupo que não a recebeu, de tal forma que não foi encontrada relação entre ATG e eventos de DECH-C por esse mecanismo. Também não foi encontrada análise semelhante na literatura.

No presente estudo, os pacientes com doadores não aparentados apresentaram 67% de risco menor para o desenvolvimento de DECH-C, talvez isso tenha ocorrido devido ao fato de que todos os pacientes que foram submetidos ao TCTH-alo não aparentado receberam ATG. Todos esses dados em conjunto sugerem que talvez a ATG tenha atuado de forma mais evidente nos linf T periféricos e tenha poupado o timo.

Houve queda das subpopulações de linf T $CD4^+CD25^+$ a partir de nove meses do TCTH, o que poderia sugerir alguma influência da ATG na proliferação de linf T reg com reflexo até os nove meses, porém não houve alteração da subpopulação de $CD127^{low}FoxP3^+$ e, além disso, padrão semelhante foi notado entre os pacientes submetidos ao TCTH-auto. Seria necessário um estudo mais específico da população de linf T reg entre os pacientes que receberam ATG em relação aos que não receberam; algo que não foi objeto de análise do presente estudo.

Não houve impacto na sobrevida dos pacientes quando comparados em relação à idade, sexo, taxa de infecções precoces, regime de condicionamento, tempo de enxertia, fonte de células-tronco, tipagem HLA, profilaxia para DECH e a própria DECH-A. Isso certamente reflete a homogeneidade na inclusão dos pacientes para o estudo, mas fortalece o resultado encontrado para a função tímica, ou seja, o resultado não é decorrente de algumas das variáveis acima expostas. No presente estudo, a função tímica diminuída antes do TCTH não apresentou impacto na SG e SLE entre os pacientes submetidos aos TCTHs-auto e -alo. A função tímica apresentou significativo decréscimo logo após o TCTH, independentemente do regime de condicionamento e as recuperações foram semelhantes entre os pacientes, independentemente do tipo de TCTH e se houve ou não eventos de DECH-C. No entanto, a recuperação foi melhor entre os pacientes TCTH-alo que não apresentaram DECH-C ao longo do primeiro ano, quando atingiram níveis próximos aos dos indivíduos saudáveis. Isso sugere que o TCTH é uma medida terapêutica que ajuda não só no combate à doença, mas também na recuperação das funções do timo para níveis similares a quem nunca foi submetido a tratamentos antineoplásicos.

Alguns autores encontraram função tímica diminuída em quem apresentou DECH-C, sugerindo que o fato de haver função tímica diminuída teria impacto ruim nos pacientes submetidos ao TCTH, exatamente por sua associação positiva com eventos de DECH-C. Eyrich e cols também encontraram função tímica diminuída entre os pacientes que apresentaram DECH-C em relação aos pacientes que não apresentaram DECH-C, em uma coorte de 164 pacientes pediátricos seguidos por 124 meses, o que os fez sugerir que eventos de DECH-C podem causar dano arquitetural ao timo, além disso, a recuperação tímica foi ainda mais prejudicada devido aos tratamentos

quimioterápicos prévios ao TCTH⁽¹²⁹⁾. Jiménez e cols, em estudo retrospectivo de 83 pacientes adultos pós-TCTH, notaram que os pacientes que apresentaram DECH-C tiveram níveis de TREC menores do que os pacientes que não apresentaram DECH-C entre nove meses e dois anos após o TCTH⁽¹³⁰⁾. A quantificação de sjTREC também se apresentou mais baixa em pacientes que desenvolveram DECH-C em relação a quem não desenvolveu em uma coorte de 33 pacientes⁽⁸²⁾.

Em outro estudo, em que foram avaliados 56 pacientes (crianças e adultos), de quatro instituições diferentes e com diferentes momentos pós-TCTH, foi encontrado que os pacientes com DECH-C em atividade no momento das coletas amostrais apresentaram níveis de TREC significativamente mais baixos em relação aos pacientes com história de tratamento para DECH-C, mas sem mais sinais de doença em atividade e também em relação aos pacientes que não apresentaram DECH-C⁽¹³¹⁾. Wils e cols, em uma coorte de 83 pacientes submetidos ao TCTH-alo, encontraram aumento da incidência cumulativa de infecções naqueles pacientes com função tímica diminuída ao longo do primeiro ano do TCTH⁽¹³²⁾. A associação entre função tímica diminuída (nível de TREC baixo) e episódios de infecção também foi encontrada em outros estudos⁽¹³³⁻¹³⁵⁾.

Em nosso estudo, a função tímica diminuída foi associada somente com DECH-C ao fim de 12 meses de TCTH, em que os pacientes que desenvolveram eventos de DECH-C ao longo do primeiro ano apresentaram função tímica mais próxima das suas situações antes do TCTH do que em relação aos indivíduos saudáveis, algo oposto em relação aos pacientes TCTH-alo que não desenvolveram DECH-C.

No entanto, os pacientes submetidos ao TCTH-auto apresentaram mediana de sjTREC mais próxima dos pacientes que desenvolveram DECH-C do que dos pacientes sem DECH-C. A idade mais avançada já foi relacionada não somente à enxertia tardia, mas também à depressão da recuperação da função tímica⁽¹³⁶⁾. No presente estudo, a média de idade dos pacientes submetidos ao TCTH-auto foi em torno de 15 anos mais do que os pacientes submetidos ao TCTH-alo sem DECH, talvez isso tenha contribuído para que os pacientes submetidos ao TCTH-alo sem DECH-C tenham apresentado melhor recuperação tímica ao fim do primeiro ano do TCTH.

Além disso, não houve associação clara com episódios de infecção seja bacteriana ou viral, isto é, os episódios de infecções ocorridos ao longo do primeiro ano foram semelhantes entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo, tendo ou não apresentado eventos de DECH-C. Esse dado sugeriu que existiu associação entre função tímica diminuída e eventos de DECH-C, independentemente da taxa de infecções ou agentes infecciosos, mas essa associação não apresentou impacto na SG ou SLE. Situação

diferente encontrada por Clave e cols em uma coorte de 102 pacientes submetidos ao TCTH-alo HLA idêntico. Após definirem um ponto de corte para o TREC, encontraram não somente incidência cumulativa aumentada para eventos de DECH-C em pacientes com níveis baixos de TREC, mas também para episódios de infecção bacteriana e por CMV, inclusive com impacto na SG⁽³⁶⁾. Talvez essa diferença possa ser evidenciada no nosso estudo com a observação dos pacientes por mais tempo, pois nossa avaliação foi interrompida ao fim de quase 20 meses, enquanto que Clave e cols observaram os pacientes por 80 meses, ou seja, houve quatro vezes mais tempo observacional.

No nosso estudo, a incidência de infecções no TCTH-alo foi maior do que no TCTH-auto, mas não foi possível demonstrar essa diferença de forma estatisticamente significativa ao longo de avaliação entre os três grupos. A incidência encontrada entre os grupos submetidos ao TCTH provavelmente foi provocada pela homogeneidade da população estudada, índices que certamente seriam diferentes se houvesse sido inclusos pacientes em outras faixas etárias, com outras doenças prévias ou condições clínicas de maior deterioração ou mesmo, pacientes com diversidades no HLA^(137, 138).

Chen e cols sugerem que a quantificação de sjTREC antes do TCTH pode prever a reconstituição imunológica T mais rápida, ou seja, pacientes com quantificação de sjTREC em valores mais baixos apresentaram taxa de recuperação da função tímica mais lenta⁽¹³⁴⁾. Em nosso estudo, não foi exatamente correlacionado o nível de sjTREC no pré-TCTH com a taxa de recuperação após o TCTH entre os pacientes com valores baixos em relação aos com valores altos.

Saglio e cols sugeriram que nível de TREC mais alto no pré-TCTH tem relação com risco reduzido de óbito após o TCTH⁽¹³⁹⁾, resultado não encontrado no presente estudo, ou seja, não houve diferença na SG entre os pacientes com nível de TREC mais baixo em relação ao mais alto, inclusive os pacientes que faleceram apresentaram taxa de recuperação do timo semelhante aos indivíduos que estão vivos.

Após serem considerados os relatos acima mencionados e mais os resultados do nosso estudo, parece haver uma relação entre função tímica enfraquecida e eventos de DECH-C. Por tal motivo, nós consideramos a hipótese da quantificação de sjTREC pouco tempo após a enxertia medular poder servir como um exame com valor preditivo para eventos de DECH-C.

A curva ROC aplicada aos três meses do TCTH sugeriu que níveis baixos de sjTREC têm boa sensibilidade em relação a futuros eventos de DECH-C, enquanto que valores mais elevados estão associados à boa especificidade para a DECH-C. No entanto, tal aferição somente nos fornece uma pista sobre a possibilidade da

utilização da quantificação de sjTREC como exame preditivo baseados em pontos de corte pré-definidos.

De uma forma mais específica, para o presente estudo a sensibilidade pode ser definida como a probabilidade de decidir se DECH-C pode se tornar presente em determinado paciente e a especificidade se a doença estará ausente até o fim do primeiro ano do TCTH. De tal maneira que, se consideramos um ponto de corte na curva ROC com valor elevado para sjTREC, isso conduz a um teste pouco sensível porém bastante específico, por outro lado, um ponto de corte com valor mais baixo conduz a um resultado exatamente oposto.

A curva ROC mostrou a relação entre a força do teste na quantificação de sjTREC aos três meses e a probabilidade de se cometer um erro de tipo I, em outras palavras, a probabilidade de se chegar a conclusão de que o paciente poderá vir a desenvolver ou não DECH-C com significância estatística quando, na verdade, talvez a relação encontrada entre a quantificação de sjTREC aos três meses e eventos de DECH-C tenha ocorrido ao acaso⁽¹³⁴⁾.

Mais ainda, o ponto de corte escolhido pode influenciar nas características do teste, ou seja, para teste muito sensível e menos específico pode ser escolhido um valor baixo de sjTREC e, assim, obter um menor número de falsos negativos, porém com riscos para falsos positivos ou, ao contrário, na escolha de um ponto de corte para valor alto de sjTREC tornaria o teste mais específico porém menos sensível e, assim, poderia ser obtida uma menor proporção de falsos positivos, porém com maior chances de falsos negativos.

Para tanto, a área sob a curva (AUC) é importante e, nesse caso, a área assumiu uma posição intermediária o que aumentam as chances de resultados falsos positivos ou negativos, independente do ponto de corte utilizado e apesar do bom nível de significância atingido.

O presente teste serviu somente como uma pista para futuros estudos para avaliar a quantificação de sjTREC como um preditor biológico, no entanto, mesmo assim só isso pode não ser suficiente, talvez a associação com outros biomarcadores e até estudos histopatológicos poderão, na análise em conjunto, realmente servirem como um parâmetro preditor confiável.

A curva ROC, no presente estudo, serviu apenas como mais uma forma de demonstrar a relação estreita entre a função tímica diminuída e eventos de DECH-C, no entanto, este teste, no momento, ainda está acompanhado de muitas armadilhas para reais interpretações.

Pensando nesse caminho, nós avaliamos as subpopulações linfocitárias e o perfil das citocinas ao longo de seis meses do TCTH, mais especificamente entre seis e 12 meses na busca de associação entre possíveis biomarcadores e eventos de DECH-C.

A despeito da alta incidência de DECH-C, a identificação de biomarcadores é difícil porque a DECH-C impacta os órgãos de diferentes maneiras ou com intensidade variável entre os indivíduos e isso influencia no prognóstico, além da variação de duração de manifestação da DECH-C, sem considerar as mais variadas formas de registro das informações clínicas entre os diferentes centros de TCTH e o emprego de diferentes imunossuppressores. Preocupado com isso, o NIH (National Institutes of Health) criou um consenso em 2005 e atualizou-o em 2014 na tentativa de diminuir tais variáveis e uniformizar os registros internacionais⁽¹⁴⁰⁻¹⁴⁴⁾.

Yu J e cols encontraram quatro biomarcadores, as proteínas ST2, CXCL9, metaloproteinase 3 da matriz e osteopontina, que quando analisados em conjunto por volta de 100 dias do TCTH podem estar correlacionados com DECH-C⁽¹⁴³⁾. Em outros estudos, CXCL9 e CXCL10 se apresentaram com níveis elevados nos pacientes com DECH-C⁽¹⁴⁴⁻¹⁴⁶⁾.

Em relação aos linfócitos T, o subgrupo citotóxico efetor de memória em estado de ativação ($CD3^+CD8^+CCR7^{neg}CD45RA^{neg}CD38^+$) pôde predizer eventos de DECH-A com média de oito dias de antecedência, tanto em crianças quanto em adultos⁽¹⁴⁷⁾. A expressão de IFN- γ foi relacionada à ausência de DECH-C precoce e as expressões de IL-4 e IL-2 à ausência de DECH-C tardio por Rozmus e cols. Os autores não encontraram relação entre a expressão de citocinas e o perfil da subpopulação linfocitária. Também não houve diferenças nas populações $CD3^+$, $CD19^+$, $CD56^+$ ou subpopulações $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$, mas notaram aumento na expressão de FoxP3⁺ nos pacientes que apresentaram DECH-C precoce e tardio⁽¹⁴⁸⁾.

Wysoczanska e cols analisaram 31 pacientes pós-TCTH com diagnóstico prévio de LMC para detecção de TREC e linfócitos TCD4⁺. Aqueles pacientes em que foi detectada a presença de TREC, apresentaram altas proporções de $CD4^+CD27^+CD45RO^{neg}$ e de $CD4^+CCR7^+$ e baixas proporções de células $CD4^+CD27^{neg}CD45RO^+$ ⁽¹⁴⁹⁾.

Em outro estudo, 60 potenciais biomarcadores (42 RNAs e 18 proteínas) foram avaliados para eventos de DECH-C em 92 amostras e não foi encontrada relação entre nenhum dos marcadores e a presença de DECH-C, mesmo discriminada em graus de intensidade⁽¹⁵⁰⁾. Ahmed e cols definiram BAFF, CXCL10 e CXCL11 como biomarcadores úteis para predizer eventos de DECH-A e DECH-C⁽¹⁵¹⁾. Sarantopoulos e cols, por exemplo, não encontraram diferença nos níveis de BAFF para distinguir intensidade de DECH-C⁽¹⁵²⁾.

Mas, independentemente da possibilidade de se encontrar potenciais biomarcadores para eventos de DECH-C, é possível perceber nuances entre os pacientes que desenvolvem DECH-C em relação a quem não desenvolve. O aumento nos níveis de TNF- α tem sido associado a eventos de DECH-A e podem ter papel de gatilho para o desencadeamento da fisiopatologia da DECH-C⁽¹⁵³⁻¹⁵⁶⁾. Acredita-se que o TNF- α tenha um papel na mediação da alorreatividade dos linf T CD8 no DECH, principalmente agudo⁽¹⁵³⁾, e ainda pode ter um papel pró-inflamatório e induzir a produção das citocinas IL-1, IL-6, GM-CSF e IFN- γ ^(157, 158). Pacientes que desenvolvem DECH (-A e -C) podem apresentar o predomínio de IL-17, TNF- α e a supressão de IL-10 e linf T reg⁽¹⁵⁹⁾. Por outro lado, o linf T reg tem papel no controle e progressão da DECH⁽¹⁶⁰⁾.

Chen X e cols, por exemplo, sugeriram que a IL-6 possui um papel crítico no balanço entre as respostas T efet e T reg. A inibição da IL-6 foi associada a diminuição de dano patológico associado ao DECH e ao aumento dos linf T reg⁽¹⁶¹⁾. Zhao D e cols encontraram relação entre a patogênese da DECH-C e a participação de linf T CD4⁺⁽¹⁶²⁾, enquanto que Rangarajan H e cols encontraram relação entre eventos de DECH-C e a expansão clonal de linfócitos T⁽¹⁶³⁾.

DECH-C também já foi associada ao aumento de IFN- γ e IL-17⁽¹⁶⁴⁾; citocinas cujo papel foi reenfocado em uma revisão da literatura⁽¹⁶⁵⁾. Além disso, já foi considerado haver uma falência no equilíbrio homeostático de controle dos linf T reg e também aumento da produção de TGF- β , o que pode acarretar fibrose como consequência final na DECH-C⁽¹⁶⁶⁾.

Em uma casuística de 157 pacientes, o desenvolvimento da DECH-C foi associada com a produção de baixo número de linfócitos T CD4⁺ naive⁽¹⁶⁷⁾. Por outro lado, a DECH-C parece ser gerada também pela atuação dos linfócitos T efet através da ativação da citocina TGF- α que exerceria um importante papel não somente na gênese da DECH-C, mas também na sua perpetuação e progressão⁽¹⁶⁸⁾.

O linf T reg apresenta plasticidade, ou seja, capacidade de manter suas atividades no controle da atividade inflamatória, mesmo que alguma de suas vias de ativação esteja inibida^(169, 170). Especificamente nos casos de DECH-C com acometimento hepático, parece haver um aumento na relação nas células IL-17/Th-1 e IL-17/T reg⁽¹⁷¹⁾. Aliás, classicamente ocorre um desequilíbrio entre as respostas Th-1/Th-2, com predomínio da Th-2 na presença de DECH-C. Por outro lado, o aumento na expressão de TGF- β pode exercer controle sobre a DECH-C, principalmente se houver maior envolvimento das células Th-1 e Th-17⁽¹⁷²⁾. TNF- α , IL-6 e IL-1 β foram relacionadas com DECH-C de

apresentação mais grave⁽¹⁷³⁾. Em contrapartida, a maior expressão de FoxP3⁺ e TGF- β juntamente com menor expressão de TNF- α estão associadas com DECH-C de manifestação mais branda e de acometimento menos extenso⁽¹⁷⁴⁾. Outros autores relataram que a intensidade de DECH-C mais grave está associada a níveis baixos de linf B⁽¹⁷⁵⁾ e a níveis elevados de linf T CD3⁺CD8⁺⁽¹⁷⁶⁾.

Hayashida e cols sugeriram que o desenvolvimento de DECH-C pode ser desencadeado pela infiltração de linfócitos Th-1 nos tecidos, mas a progressão pode estar mais relacionada à resposta Th-2. Na comparação da expressão de citocinas com o grau de infiltração linfocitária em DECH-C oral, Hayashida e cols encontraram associação das citocinas IL-2 e IFN- γ com a presença de infiltração linfocitária, mas a intensidade de infiltração esteve melhor relacionada com as citocinas IL-4 e IL-5⁽¹⁷⁷⁾. Ratanatharathorn e cols associaram a elevação de citocinas envolvidas na resposta Th-2 à DECH-C, em sua revisão da literatura⁽¹⁷⁸⁾.

DECH-C também foi associada à diminuição de linf T CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺^(179, 180), ao seu aumento de CD4⁺CD25^{high} ou mesmo sem alteração CD3⁺CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺⁽¹⁸¹⁾ em relação aos pacientes que não desenvolveram DECH-C. Outros autores conflitam em relação ao linf B CD19⁺, em que, em vigência de DECH-C, é sugerido o aumento do linf B CD19⁺⁽¹⁸²⁾ ou mesmo diminuição da contagem⁽¹⁸³⁾.

Já foi encontrado em pacientes com DECH-C o aumento simultâneo das populações B e T, mais especificamente, ocorreu o aumento da população de linf B (CD19⁺CD21^{low}) e da população de linf T ETR CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺) nos pacientes com DECH-C⁽¹⁸⁴⁾ e também já foi relacionado o atraso na reconstituição da célula NK com DECH-C⁽¹⁸⁵⁾.

Bohmann et cols sugeriram outros comportamentos das populações de células diante da DECH-C, as células *naïve* podem estar em baixa contagem em pacientes com DECH-C em estado quiescente. Não foram encontradas diferenças na produção de citocinas entre os pacientes com DECH-C de novo e os pacientes sem DECH-C e o aumento acelerado de linf T CD3⁺CD4⁺ pôde predizer eventos de DECH-C de novo⁽¹⁸⁶⁾.

Em nosso estudo, os pacientes que desenvolveram DECH-C apresentaram a população de linfócitos T CD3⁺ diminuída entre seis e 12 meses em relação aos pacientes que não desenvolveram DECH-C. No entanto, não houve diferenças em relação às suas subpopulações CD4⁺ ou CD8⁺ ou em relação à população de linf B CD19⁺. A população de células NK CD56⁺ apresentou redução gradual ao longo do

tempo, mas se manteve sempre maior nos pacientes com DECH-C em relação aos pacientes sem DECH-C.

Não houve distinção entre os ETR $CD4^+$ ou $CD8^+$ entre os pacientes que desenvolveram DECH-C e os que não desenvolveram, mas foi notado um aumento gradativo da subpopulação do ETR $CD4^+$ com o passar do tempo, em todos os grupos, com uma quase constante contagem em relação ao ETR $CD8^+$.

A relação entre $ETRCd8^+/ETRCd4^+$ foi semelhante aos seis meses entre pacientes com DECH-C e sem DECH-C (6,85 vezes mais $ETRCd8^+$ em relação ao $ETRCd4^+$ para DECH-C e 7,58 vezes mais para pacientes sem DECH-C), mas que se distancia aos 12 meses entre os grupos de pacientes com DECH-C, mostrando que pode haver um retardo na recuperação do $ETRCd4^+$ nos pacientes que desenvolveram DECH-C em relação aos que não desenvolveram (5,2 vezes mais $ETRCd8^+$ em relação ao $ETRCd4^+$ para DECH-C e 3,6 vezes mais para pacientes sem DECH-C). Isso sugere que o timo pode apresentar alteração mais específica na produção dos linfócitos $TCD3^+CD4^+$ diante da DECH-C do que propriamente em toda a produção celular de linfócitos.

Em relação às subpopulações T *naive*, *men cen*, *efet* e *mem efet*, seus estados de ativação ou suas resposta Ths (1,2 ou 17), não houve diferenças entre os pacientes que desenvolveram DECH-C e os que não apresentaram eventos de DECH-C. Exceto que houve um aumento gradativo do componente Th-17 entre as células *naive* e *efet* com o passar do tempo, mas sem diferenças entre os pacientes que desenvolveram DECH-C em relação aos que não desenvolveram DECH-C. Em relação à subpopulação T reg, não houve diferenças entre os pacientes com DECH-C em relação aos sem DECH-C.

Exceto por algumas alterações entre períodos de avaliação, na análise dos perfis de citocinas entre os pacientes com DECH-C em relação a quem não desenvolveu DECH-C, não houve diferenças significativas. O perfil de apresentação de todas as respostas Th-1, Th-2, Th-17 e reguladora foram semelhantes entre os grupos. O que pôde ser notado é que, relativo à resposta Th-1, houve predomínio do IFN- γ . Em relação à resposta Th-2, houve um predomínio da IL-5. Quanto à resposta Th-17, houve leve predomínio da IL-17; em relação à resposta reguladora, houve amplo predomínio da TGF- β_1 . Em média quase constante e independente dos grupos e tempos avaliados, a ordem de expressão, de menor para maior, foi Th-17, Th-2, Th-1 e T reg, em que IL-17 foi sete vezes menos expressiva do que IL-5, que por sua vez, foi cinco vezes menos expressiva do que IFN- γ , a qual foi 13 vezes menos expressiva do que TGF- β_1 .

A redução dos linfócitos T pelo regime de condicionamento sugere que, pelo menos em parte, os linfócitos T maduros fazem parte da fisiopatologia da DECH-C^(104,187-195).

Linfócitos T ativados podem sofrer expansão clonal e se diferenciarem nos três grupos celulares ligados à reposta Th e esse mecanismo efetor inclui a produção de citocinas^(119, 196). A relação Th-1/Th-2 ainda precisa ser mais bem elucidada, mas parece que a resposta Th-1 está mais associada à DECH-A, enquanto que Th-2 está mais relacionada à DECH-C^(148, 197-199).

Por outro lado, cada vez mais, a subpopulação Th-17 está sendo implicada como atuante de destaque na DECH-C, por meio da ativação da STAT-3 ou por interações na PD-1, também está sendo associada à piora na gravidade da DECH-C em determinados órgãos como pele e fígado, em que a DECH-C pode estar associada pela produção das citocinas IL-21 e IL-22 ou mesmo por um desequilíbrio entre linf Th-17 e linf T reg⁽²⁰⁰⁻²¹¹⁾.

Diante da desregulação imune, pode ocorrer um predomínio dos linf T efet que deixam de receber controle dos mecanismos reguladores do organismo, em parte isso ocorre devido ao emprego de inibidores da calcineurina na profilaxia para DECH-A. Parece que a desregulação imune é central e periférica e que ocorre falha na “tolerância operacional” e, como consequência ocorre hiperatividade dos linf T efet^(212, 213), além do decréscimo por si só do linf. T reg ou da atividade do receptor de quimiocina CXCR3 devido ao aumento das atividades das células NK^{bright(214, 215)}.

Outro mecanismo também envolvido na DECH-C ocorre por meio de defeitos na seleção positiva/negativa durante a maturação do tímócito no timo e liberação das células *naive*, sendo que ambas as células, a tímica e a epitelial tímica cortical e medular sofrem com a ação dos linf T efet do doador^(77, 216-221). A perda da tolerância operacional ao linf B e o desenvolvimento de anticorpos contra antígenos de histocompatibilidade menores também são relevantes, sendo o anticorpo anticromossoma Y produzido por doadoras mulheres contra receptores homens o melhor exemplo. Alterações aberrantes nas vias de sinalização que envolve o BCR e o BAFF podem contribuir para atividade anômala do linf B^(152, 222-229) ou ainda supressão de atividades da subpopulação de linf B reg⁽²³⁰⁻²³²⁾.

Por fim, ocorre o reparo anormal do tecido atingido e fibrose. Nessa fase, ocorre uma rápida interface entre as respostas inata e adquirida, na qual surge a atuação das células mieloides e macrófagos e das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6, reguladas pela TGF- β e o envolvimento das células com perfil Th-2 e Th-17 e a secreção das citocinas IL-13, IL-17 e IFN- γ com características pró e anti-fibróticas. Em último estágio, ocorre o acúmulo de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, gerando a fibrose e a disfunção dos órgãos atingidos^(165, 231-244).

Para o presente estudo, não houve o objetivo de reconhecer vias ou estabelecer a fisiopatologia que existe por trás da DECH-C, mas, ao tentar caracterizar a função

tímica e a resposta adaptativa, podem-se traçar especulações a respeito dos caminhos que envolvem a construção da DECH-C e que, porventura, podem diferenciar-se dos pacientes submetidos ao TCTH-alo sem DECH-C ou mesmo do TCTH-auto. Em nosso estudo, a recuperação da função tímica dos pacientes que desenvolveram DECH-C impediu que eles atingissem níveis semelhantes a indivíduos normais e houve pouca melhora da função em relação à situação anterior ao TCTH.

Durante a recuperação do sistema imune, exceto pela população de células NK, não houve de forma significativa a distinção de alguma subpopulação linfocitária T ou do perfil de citocinas, seja Th-1, Th-2, Th-17 ou mesmo T reg, entre os dois tipos de TCTH (-auto e -alo) e, especificamente, entre os TCTH-alo com e sem DECH-C. A incidência de infecções em geral também foi semelhante entre os três grupos ao longo do tempo, com predomínio não estatisticamente significativa a partir dos nove meses para os pacientes que desenvolveram DECH-C, ou seja, a taxa de infecções não influenciou a apresentação do compartimento linfóide T ao longo dos seis meses de avaliação.

No presente estudo, não foi encontrada uma associação consistente entre as subpopulações linfocitárias T ou as citocinas e eventos de DECH-C, exceto por alguns resultados anedóticos. No entanto, na revisão da literatura mundial, de um modo geral, parece que a DECH afeta a arquitetura do timo o que acarretará inadequado controle negativo durante a formação dos linfócitos T jovens, com isso, aumenta o número de linfócitos T CD4⁺ efetores com capacidade de atuar contra o próprio organismo e com baixa capacidade de diferenciação dos antígenos, isto é, ocorre a formação clonal inespecífica das subpopulações T com alto poder reativo. Com o passar do tempo, pode ocorrer um aumento das IL-6 e TNF- α e desregulação Th-1/Th-17 com elevações dos níveis da IL-17. Além disso, pode ocorrer haver aumento do IFN- γ e diminuição do controle do sistema imune devido à redução da população de linf T reg. A persistência do fenômeno DECH-C, pelas alterações nas subpopulações T e nas citocinas, pode induzir ao reparo celular errático com formação de fibrose e, dependendo da extensão da doença, consequente limitação das atividades do indivíduo e queda na qualidade de vida (anexo I).

Existem algumas hipóteses que podem ser consideradas para os resultados encontrados no presente estudo: como primeira, seria a homogeneidade da amostra, na qual se limitaram extremos de idade, como crianças e adolescentes e indivíduos acima de 60 anos, limitou-se o número de patologias prévias com indicação ao TCTH (foram evitadas doenças hematológicas crônicas, anemia aplástica, doenças benignas e neoplasias não hematológicas), limitou-se o tipo de TCTH para HLA's totalmente compatíveis e ao fato de todos os pacientes apresentarem boas condições clínicas para

suportar o TCTH, além da exclusão de pacientes timectomizados ou HIV⁺ e, a exclusão de pacientes que receberam infusão de linfócitos após o TCTH. Por outro lado, a melhor homogeneidade da amostra isola a relação entre “função tímica, subpopulações linfocitárias T e citocinas” e eventos de DECH-C, o que reforça os dados encontrados, já que o encontro de algum resultado diferente poderia ser considerado advindo dessa relação de forma mais convicta; assim sendo, os achados de semelhança encontrados no presente estudo entre as subpopulações linfocitárias T e as citocinas são resultados suportados exatamente por essa homogeneidade. A não inclusão de pacientes com disparidades HLA, timectomizados, HIV⁺ e outras patologias reduziu vieses de interpretação e diminuiu possíveis fatores de confusão entre os resultados apresentados.

A segunda hipótese seria o tempo de observação. No presente estudo, a maioria dos pacientes foi observada somente até um ano e seis meses. Talvez mais tempo e o surgimento de mais eventos de DECH-C e/ou óbitos e/ou recaídas de doenças pudessem discriminar as populações.

Terceira hipótese, o número amostral pode ter sido insuficiente para separar características das subpopulações T ou das citocinas entre os três grupos, muito embora o nosso “n” não tenha diferido da maioria dos estudos, aliás, pelo contrário, ele se apresentou maior do que em muitos estudos aqui discutidos.

Quarta hipótese, no presente trabalho, foi evitada a separação ainda maior entre os grupos tais como a análise do perfil das subpopulações e de citocinas tendo como pontos de corte idade (<vs ≥50 anos), regime de condicionamento (MAC vs RIC), HLA (aparentado versus não aparentado), tempo de enxertia (precoce versus tardia) e função tímica (valor baixo versus valor alto) ou ainda, o contrário, a análise da função tímica entre pacientes com determinado ponto de corte para determinada população celular ou citocina, ou ainda, a relação entre as respostas efectoras e reguladoras e a forma de recuperação tímica.

Quinta hipótese, os eventos de DECH-C não foram discriminados como precoces e tardios, limitados ou extensos, por órgãos ou por grau de intensidade, bem como não foram discriminados os eventos de DECH-C de acordo com eventos de DECH-A e suas formas de apresentação, duração, órgãos acometidos ou mesmo intensidade.

Sexta e última hipótese, os resultados encontrados podem diferir de vários encontrados na literatura, porém também deve ser considerada a variabilidade de amostras e as formas de captação dos dados e de análises entre os diferentes centros e países - situação que qualifica os resultados encontrados.

Apesar dos motivos já citados, talvez o principal motivo para discrepância entre os resultados do presente estudo e os encontrados na literatura se deva ao fato do

momento da coleta das amostras. No caso da pesquisa das subpopulações linfocitárias T e das citocinas, a coleta amostral ocorreu quando metade dos pacientes já haviam apresentado eventos de DECH-C enquanto que muitos dos estudos citados, a coleta amostral ocorreu antes do advento do evento de DECH-C. Além disso, alguns dos estudos apresentados foram realizados em cobaias com estudos controlados, enquanto que no nosso estudo, o tempo real foi obedecido através de seguimento prospectivo. Deve ser reforçado também que os estudos com coleta mais precoce estão sujeitos a maior variabilidade populacional T e ao maior número de episódios de infecção enquanto que em coleta mais tardias, já pode ter ocorrido a recuperação do compartimento linfoide T e o número de infecções reduz significativamente.

Por fim, apesar das limitações impostas por nós na população estudada, foi evidenciada uma relação estreita entre eventos de DECH-C e função tímica diminuída, o que permite nortear as futuras pesquisas na área para um horizonte investigativo.

6 CONCLUSÕES

Geral

Os eventos de DECH-C interferiram na reconstituição das funções do timo de tal maneira que ao final do primeiro ano os pacientes apresentaram função tímica mais semelhante ao seu estado anterior ao TCTH do que mais próximo das funções tímicas de indivíduos saudáveis, além disso, a recuperação do sistema imunológico parece ocorrer de forma uniforme e independente do tipo de TCTH ou dos eventos de infecções e DECH-C. No entanto, essas conclusões se limitam somente a pacientes submetidos ao TCTH-alo HLA idênticos. Não podem ser extrapoladas para pacientes HLA com disparidades, principalmente, haploidênticos ou mesmo aqueles que receberam sangue do cordão umbilical.

Futuras análises ainda poderão ser feitas com base nos mesmos dados coletados, porém as informações por ora explicitadas já poderão contribuir como complemento para ações de pesquisa no futuro. O raciocínio presente poderá dar suporte à busca de medidas de prevenção à deterioração da função tímica no pré-TCTH, como no pós-TCTH em relação ao estabelecimento de um conjunto de dados biológicos com pontos de corte em períodos pré-determinados. Os resultados encontrados poderão servir de base para futuros estudos, como a criação de exames que antecipem eventos de DECH-C ou até mesmo a construção de medidas terapêuticas de intervenção precoce na DECH-C. As análises iniciais expostas suscitam a curiosidade de seguir em frente na estratificação por subgrupos e na observação dos detalhes ainda ocultos, porém certamente existentes.

Específicas

- a) Na população brasileira, a função tímica foi superior entre os indivíduos saudáveis em relação aos pacientes pós-tratados para doenças hematológicas malignas;
- b) No presente estudo, considerando a casuística, a função tímica diminuída foi o único fator de risco para eventos de DECH-C, em detrimento aos demais fatores de risco divulgados na literatura mundial;
- c) Ao longo do primeiro ano do TCTH, houve um predomínio de infecções nos pacientes submetidos ao TCTH-alo em relação ao TCTH-auto, porém não foi possível estatisticamente distinguir a incidência de infecções entre os submetidos ao TCTH-alo que apresentaram episódios de DECH-C em relação aos que não desenvolveram DECH-C.
- d) Entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo, a incidência cumulativa de infecções bacterianas ou por CMV foi semelhante, enquanto que a incidência cumulativa de eventos de DECH-C foram significativamente maiores nos pacientes que possuíam função tímica diminuída antes do TCTH, fato oposto para eventos de DECH-A (graus III-IV);
- e) Houve duas situações que influenciaram na SG até próximo a 20 semanas de seguimento, o regime de condicionamento e o tempo de enxertia medular. A função tímica não influenciou na SG na presente casuística. O grupo de pacientes submetidos ao TCTH-auto com enxertia medular mais precoce apresentou melhor SG em relação aos demais grupos comparados;
- f) Não houve influência na SLE nos pacientes submetidos ao TCTH-alo, ao serem considerados os fatores idade, sexo, doador (aparentado ou não), regime de condicionamento, fonte de células-tronco hematopoiéticas; tempo de enxertia neutrofílica, infecções por CMV, compatibilidade ABO, infusão CD34⁺, profilaxia para DECH, eventos de DECH-A e função tímica;
- g) Não houve influência na SLE nos pacientes submetidos ao TCTH-auto ao serem considerados os fatores idade, sexo, infecções até 90 dias, tempo de enxertia neutrofílica e função tímica;

- h) Não houve diferença na recuperação da função tímica até um ano do TCTH entre os pacientes que faleceram e os que permaneceram vivos ou entre os pacientes que receberam ATG e os que não receberam;
- i) A proporção de linf T $CD3^+$, linf B $CD19^+$ e células NK $CD56^+$ não foi semelhante entre os pacientes submetidos ao TCTH-alo que desenvolveram DECH-C, os que não desenvolveram DECH-C e, aos submetidos ao TCTH-auto. A relação, em conjunto, ao longo do tempo obedeceu mais ou menos a seguinte proporção: 4,7/1/1 entre linf T $CD3^+$ /linf B $CD19^+$ /cel. NK $CD56^+$ aos seis meses e 3,8/1,6/1 ao final do primeiro ano do TCTH, ou seja, houve alteração na proporção entre as populações à custa de estabilidade na população T, leve aumento na B e leve declínio na NK.

7 ANEXOS

Anexo A: Quadro 3. Classificação e estadiamento da DECH-A

Órgão	Pele	Fígado	Intestino
Estágio	SC (%)*	Bilirrubina (mg/dL)	Diarréia (mL/dia)
1	exantema <25	2,0-2,9	500-1000 ou envolvimento de trato GI comprovado por Bx
2	exantema 25-50	3,0-6,0	1000-1500
3	exantema >50	6,1-15	1500-2000
4	eritema generalizado com bolhas	>15	>2000 ou dor abdominal importante com ou sem íleo
Graduação	Pele	Fígado	Intestino
I	estágio 1-2	nenhum	nenhum
II	estágio 3	estágio 1	estágio 1
III		estágio 2-3	estágio 2-4
IV	estágio 4	estágio 4	
Classificação IBMTR	Pele	Fígado	Intestino
A	estágio 1	nenhum	nenhum
B	estágio 2	estágio 1-2	estágio 1-2
C	estágio 3	estágio 3	estágio 3
D	estágio 4	estágio 4	estágio 4

Legenda: GI: gastro-intestinal; IBMTR: International Bone Marrow Transplant Registry; SC: superfície corporal.

*usar a "regra dos nove" para determinar a área corporal

Fonte: quadro adaptado de Glucksberg et al (1974) apud Cutler e Jacobsen (2009)⁽²⁴⁵⁾

Anexo B1: Quadro 4. Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos para DECH-C

Órgão ou sítio envolvido	Diagnóstico	Distinto	Outras características	Comum
Pele	poiquilodermia características semelhantes à: líquen plano escleróticas morféia líquen escleroso	despigmentação	suor comprometido ictiose ceratose pilar hipopigmentação hiperpigmentação	eritema <i>rash</i> maculopapular prurido
Unha		distrofia sulcos ou rachaduras longitudinais onicólise pterígio ungueal perda de unha (usualmente de forma simétrica)		
Couro cabeludo e pêlos do corpo		alopécia cicatricial descamação lesões papuloescamosas	cabelo fino, seco, desigual e/ou branco prematuramente	
Boca	restrição da abertura bucal devido à esclerose características semelhantes à: líquen placas de hiperqueratose	xerostomia mucocele atrofia de mucosa pseudomembranas úlceras		gengivite mucosite eritema dor
Olhos		dor ou sensação de olho seco ou arenoso conjuntivite cicatricial ceratoconjuntive sicca confluência de áreas de ceratopatia pontuada	fotofobia hiperpigmentação periorbital blefarite	
Genitália	características semelhantes à: líquen plano estenose ou rachaduras na vagina	erosões fissuras úlceras		

Continua...

Anexo B1 (conclusão): Quadro 4. Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos para DECH-C

Aparelho GI	estreitamento ou estenose na porção superior até metade do 1/3 inferior do esôfago		insuficiência pancreática exócrina	anorexia náuseas vômitos diarréia perda de peso desenvolvimento retardado (crianças e adolescentes)
Fígado				BT, FA >2x o LSN TGO ou TGP >2x o LSN
Pulmão	bronquiolite obliterante, diagnóstico por Bx	bronquiolite obliterante, diagnóstico por teste pulmonar ou por imagem		bronquiolite obliterante pneumonia organizacional
Articulações, músculo, fáscia	fasciíte estreitamento articular ou contratura por esclerose	miosite ou polimiosite	edema cãimbras artralgias ou artrite	
Sistema imune ou hematopoiético			trombocitopenia eosinofilia linfopenia hipo ou hipergamaglobulinemia AHAI ou PTI (autoanticorpos)	
Outras alterações			derrame pleural ou pericárdico ascite neuropatia periférica síndrome nefrótica Miastenia <i>gravis</i> cardiomiopatia ou anormalidade na condução cardíaca	

Legendas: AHAI: anemia hemolítica auto-imune; PTI: púrpura trombocitopênica idiopática; BT: bilirrubina total; Bx: biópsia; FA: fosfatase alcalina; GI: gastro-intestinal; LSN: limite superior da normalidade

Fonte: Quadro adaptado do Consenso NIH 2005, apud Cutler e Jacobsen (2009)⁽²⁴⁵⁾

Anexo B2: Quadro 5. Escore clínico para classificação da DECH-C

Escore clínico - performance	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
ECOG, KPS ou LPS ()	assintomático	sintomático	sintomático	sintomático
	ativo, sem restrições ECOG 0 KPS ou LPS 100%	restrito para atividades extenuantes ECOG 1 KPS ou LPS 80-90%	>50% das horas para atividades, não está restrito ao leito ECOG 2 KPS ou LPS 60-70%	>50% das horas restrito ao leito ECOG 3-4 KPS ou LPS <60%
Pele rash maculopapular liquen plano-like lesões papuloescamosas ou ictiose hiperpigmentação hipopigmentação ceratose pilar eritema eritroderma poiquiloderma características escleróticas prurido envolvimento do cabelo envolvimento das unhas % da SC envolvida ()	ausência de sintomas	<18% da SC comprometida, mas sem características de esclerose	19-50% da SC ou envolvimento esclerótico superficial (capacidade de pinçamento)	>50% da SC ou presença de esclerose profunda com incapacidade de pinçamento ou até mobilidade prejudicada, ulcerações ou prurido intenso
Boca	ausência de sintomas	sintomas e sinais leves presentes, mas não impedem a ingestão adequada de alimentos	sintomas e sinais moderados presentes que provocam limitação parcial da ingestão	sintomas e sinais tão intensos que limitam bastante a ingestão alimentar
Olhos	ausência de sintomas	sintomas e sinais leves presentes, mas não impedem a ingestão adequada de alimentos	sintomas de olho seco que afetam parcialmente as AVD e requer >3 gotas de colírio, sem afetar a visão	sintomas de olho seco que afetam as AVD ou incapacitam para o trabalho ou ocorre perda da visão por ceratoconjuntivite seca
teste médio da lágrima (mm): () >10 () 6-10 () ≤5 () não realizado				

Continua...

Anexo B2 (conclusão): Quadro 5. Escore clínico para classificação da DECH-C

Aparelho GI	ausência de sintomas	sintomático, mas com perda ponderal <5%	sintomático, mas com perda ponderal 5-15%	sintomático, mas com perda ponderal >15% ou necessidade de dilatação esofageana
Fígado	valores BT, FA, ALT e AST normais	Elevação nos níveis de BT, FA, ALT e AST <2x o LSN	BT >3 mg/dL ou BT, enzimas 2-5x o LSN	BT ou enzimas >5x o LSN
Pulmões FEV ₁ () CDC ()	ausência de sintomas FEV ₁ ≥80% ou EP= 2	sintomas leves: respiração curta após a subida de um andar de escadas FEV ₁ 60-79% ou EP= 3-5	sintomas moderados: respiração curta após caminhar em ambiente plano FEV ₁ 40-59% ou EP= 6-9	sintomas intensos: respiração curta em repouso, com necessidade de O ₂ FEV ₁ ≤39% ou EP= 10-12
Articulações ou fâscias	ausência de sintomas	leve rigidez de membros, com movimentos normais, não afeta as AVD	rigidez de membros ou contraturas articulares, eritema por fasciíte, diminui a amplitude dos movimentos e causa certas limitações nas AVD	contraturas com decréscimo significativo da amplitude dos movimentos e com limitação significativa das AVD
Aparelho genital	ausência de sintomas	sintomático com sinais leves, mas não afetam a VS ou o EF	sintomático com moderados sinais, leve dispareunia ou presença de desconforto ao EF	sintomático com sinais importantes, dor na VS e ao EF
Outros indicadores (assinalar e tentar classificar como leve, moderado ou intenso):				
estreitamento esofágico ascite miastenia grave polimiosite plaquetas <100.000/μL		derrame pericárdico síndrome nefrótica cardiomiopatia defeitos na condução cardíaca progressão dos sintomas		derrame pericárdico neuropatia periférica eosinofilia >500μL coronárias comprometidas outro:

Legendas: ALT (ou TGP): alanina aminotransferase; AST (ou TGO): aspartato aminotransferase; AVD: atividades da vida diária; BT: bilirrubina total; CDC: capacidade de difusão do monóxido de carbono; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; EF: exame físico; EP: escore pulmonar; FA: fosfatase alcalina; FEV₁: volume expiratório forçado em um segundo; GI: gastro-intestinal; KPS: Karnofsky Performance Status; LPS: Lansky Performance Status; LSN: limite superior da normalidade; SC: superfície corpórea; VS: vida sexual ⁽²⁴⁶⁾

Anexo B3: Quadro 6. Graduação da intensidade de DECH-C

Leve	até 2 órgãos envolvidos (sem envolvimento pulmonar) com escore 1
Moderado	1 órgão (exceto pulmão) envolvido com escore 2 ou ≥ 3 órgãos envolvidos com escore 1 ou envolvimento do pulmão com escore 1
Intenso	envolvimento do pulmão com escore 2 ou qualquer outro órgão com escore 3

Legendas: DECH-C: doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica

Fonte: Quadro adaptado do Consenso NIH 2005, apud Cutler e Jacobsen (2009)⁽²⁴⁵⁾

Anexo C1: Quadro 7. (parte 1) Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos na DECH-C (formulário A – avaliação do médico)

Formulário A		DECH-C - avaliação do médico			
Peso:	Data:	Nome:			
classificação geral sinais e sintomas					3+: muito melhor 2+: melhor 1+: pouco melhor 0: igual 1-: pouco pior 2-: pior 3-: muito pior
0= ausente 1= leve 2= moderado 3= importante	impressão geral sobre o paciente de 0 - 10: () em relação ao DECH-C, com o passar do tempo, o paciente está:				
Cavidade oral (área comprometida)	eritema lesão liquenóide úlceras	ausente (0) ausente (0) ausente (0)	leve (<25%) (1) leve (<25%) (1) moderado (≤ 20%) (3)	moderado (25-50%) (2) moderado (25-50%) (2) importante (≥ 50%) (3)	importante (≥ 50%) (3) importante (≥ 50%) (3) importante (> 20%) (6)
					escore total: ()
Trato gastro-intestinal					
(esôfago)	disfagia ou odinofagia	0= ausência de sintomas 1= disfagia ou odinofagia ocasional na ingestão de alimentos sólidos ou comprimidos durante a última semana 2= disfagia ou odinofagia intermitente na ingestão de alimentos sólidos ou comprimidos durante a última semana 3= disfagia ou odinofagia para quase tudo que é ingerido, mesmo líquidos, em quase todos os dias na última semana			
(alto)	saciedade precoce ou anorexia ou náuseas e vômitos	0= ausência de sintomas 1= sintomas ocasionais, leves, com pouca redução da ingestão oral durante a última semana 2= sintomas intermitentes, moderados, com alguma redução da ingestão oral durante a última semana 3= sintomas persistentes, mais intensos, com evidente redução da ingestão oral em quase todos os dias na última semana			
(baixo)	diarréia	0= ausência de diarréia ou fezes líquidas durante a última semana 1= diarréia ou fezes líquidas de forma ocasional, em alguns dias durante a última semana 2= diarréia ou fezes líquidas de forma intermitente, em quase todos os dias durante a última semana, mas sem necessidade de intervenção clínica 3= diarréia volumosa em quase todos os dias na última semana, com necessidade de intervenção clínica			
Pulmão (bronquiolite obliterante) (parâmetros de espirometria)	FEV1(%):	CVF:	DLCO:		CPT:
Fígado	bilirrubinas (total): mg/dL	LSN:	FA:	LSN:	ALT (TGP): U/L
Outras formas de avaliação	caminhada (distância percorrida): () 2 min () 6 min	índice Karnofsky ou Lansky *:	plaquetas: mg/dL	leucócitos: mg/dL	eosinófilos: %
Outra anormalidade presente, porém totalmente explicável por causa não-DECH:					

Legendas: ADM: amplitude de movimento; ALT: alanina aminotransferase; CVF: capacidade vital forçada; CPT: capacidade pulmonar total; DLCO: difusão de monóxido de carbono; FA: fosfatase alcalina; FEV1: volume expiratório forçado em 1 segundo; LSN: limite superior da normalidade; SC: superfície corpórea; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VR: volume de reserva

*Maiores informações no anexo D

Fonte: quadro adaptado de Lee SJ e cols Biol Blood Marrow Transplant 21 (2015): 984-99⁽²⁴⁶⁾

Anexo C1: Quadro 7. (parte 2) Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos na DECH-C (formulário A – avaliação do médico)

Formulário A	Escore zero	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Pele (aspectos) rash maculopapular/eritema lesões semelhantes à liquen plano características escleróticas lesões papulo-escamosas ou ictiose lesões semelhantes à queratose pilar Pele (características)	SC não envolvida () ausência de esclerose	1-18% de SC envolvida ()	19-50% de SC envolvida () características escleróticas superficiais (existe a capacidade de pinçamento)	>50% de SC envolvida () () características escleróticas profundas () <i>hidebound</i> *: incapacidade de pinçamento () mobilidade limitada () ulcerações ## ticar umas das quatro alterações acima descritas Impressão geral sobre grau de envolvimento da pele 0 - 10: ()
Anormalidade presente, porém totalmente explicável por causa não-DECH:				
Olhos	() ausência de sintomas	() olho seco, grau leve (uso de colírio lubrificante ≤3 x/dia)	() olho seco, grau moderado (uso de colírio lubrificante >3 x/dia)	() olho seco, grau intenso (presença de dor ou impede as atividades diárias ou até diminuição da visão)
Anormalidade presente, porém totalmente explicável por causa não-DECH:				
Pulmões	() ausência de sintomas	() leve: dificuldade de respiração após caminhar em subidas	() moderado: dificuldade de respiração após caminhar em ambiente plano	() intenso: dificuldade de respiração mesmo em repouso, necessidade de O ₂
Anormalidade presente, porém totalmente explicável por causa não-DECH:				
Articulações e fáscia	() ausência de sintomas	() leve: rigidez leve dos braços ou pernas, ADM diminuída	() moderado: rigidez moderada dos braços ou pernas, contratura nas articulações e eritema presente devido à fascíte, ADM moderadamente diminuída	() Contraturas presentes com significativa ADM diminuída e com significativa limitação da qualidade de vida
Anormalidade presente, porém totalmente explicável por causa não-DECH:				

Legendas: ADM: amplitude de movimento; SC: superfície corpórea; *hidebound (do inglês, limitado, incapaz de alteração): aqui se traduz pela incapacidade de pinçamento da pele durante o exame físico devido a rigidez que a pele apresenta

Fonte: quadro adaptado de Lee SJ e cols Biol Blood Marrow Transplant 21 (2015): 984-99⁽²⁴⁶⁾

Anexo C2: Quadro 8. Escore clínico para avaliação de órgãos envolvidos para DECH-C (formulário B – avaliação do paciente)

Formulário B A - intensidade dos sintomas nos últimos 7 dias (impressão do paciente):	relato do paciente										
	ausente										muito intenso
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. sensação de prurido na pele?	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()
2. sensação de restrição ao movimento por envolvimento da pele ou das articulações?	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()
3. sensação de desconforto na cav. Oral?	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()
4. sensação de desconforto em região genital?	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()
5. sensação de desconforto ocular?	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()	()
Cite o desconforto ocular:											
B - avaliação geral (impressão do paciente):											
1. qual a impressão de classificação para a DECH-C? () leve () moderada () intensa											
2. qual a impressão de intensidade dos sintomas da DECH-C? Classifique-a entre 0 a 10: ()											
3. comparado com um mês atrás, qual a impressão em relação aos sintomas?											
3+: muito melhor											
2+: melhor											
1+: pouco melhor											
0: igual											
1-: pouco pior											
2-: pior											
3-: muito pior											

Legendas: cav.: cavidade

Fonte: quadro adaptado de Lee SJ e cols Biol Blood Marrow Transplant 21 (2015): 984-99⁽²⁴⁶⁾

Anexo D: Quadro 9. Avaliação de desempenho dos pacientes em suas atividades diárias de acordo com critérios clínicos objetivos

Critérios para avaliação de <i>performance status</i> clínico - relação entre as escalas de ECOG, Karnofsky e Lansky					
ECOG		Karnofsky		Lansky	
Escore	Descrição	Escore	Descrição	Escore	Descrição
0	Totalmente ativo, não há restrições	100	Sem queixas, sem evidências de doença em atividade	100	Totalmente ativo
		90	Atividades diárias sem restrições, pequenos sinais ou sintomas de doença em atividade	90	Pequenas restrições em atividades extenuantes
1	Impossibilitado para atividades extenuantes, porém hábil para esforços leves	80	Atividades usuais com esforço, alguns sinais ou sintomas de doença em atividade	80	Ativo, porém se cansa com facilidade
		70	Mantém o auto-cuidado, mas incapaz de manter atividades usuais de esforço com a mesma intensidade de outrora	70	Menor tempo de disposição para as atividades diárias e as execuções das atividades ocorrem com maiores limitações
2	Incapaz para qualquer atividade de esforço físico. Mais de 50% do tempo com capacidade de deambulação	60	Ocasionalmente requer assistência	60	Poucas atividades com esforço, mas mantém as leves
		50	Requer considerável assistência. Necessidade de cuidados médicos com frequência	50	Veste-se sozinho, incapaz de qualquer atividade com esforço, somente as leves, repousa boa parte do tempo
3	Capacidade limitada ao auto-cuidado. Confinado ao leito ou cadeira em mais de 50% do tempo	40	Incapacidade física, necessidade de assistência constante e cuidados especiais	40	Participa de algumas atividades leves, maior parte do tempo está em repouso
		30	Incapacidade física importante com necessidade de hospitalização	30	Permanece restrito ao leito, com necessidade de assistência para qualquer tipo de atividade
4	Totalmente dependente de ajuda externa e confinado ao leito ou cadeira	20	Muito doente, hospitalização é imperativa	20	Dorme a maior parte do tempo, totalmente dependente
		10	Moribundo, doença em franca progressão	10	Nenhuma atividade, totalmente restrito ao leito
5	Óbito	0	Óbito	0	Óbito

Fonte: quadro adaptado de CIBMTR (center for international blood & marrow transplant research - forms manual, appendix L, 2009)⁽²⁴⁷⁾

Anexo E: Quadro 10. Regimes de condicionamento aplicados no TCTH dos pacientes participantes do presente estudo

Regimes de condicionamento para TCTH-auto

BEAM: BCNU (carmustine) 300mg/m² + etoposide 400 - 800mg/m² + citocina arabinosídeo 800 - 1600mg/m² + melfalano 140mg/m²
 EAM: etoposide 400 - 800mg/m² + citocina arabinosídeo 800 - 1600mg/m² + melfalano 140mg/m²
 LEAM: CCNU (lomustine) 200mg/m² + etoposide 400 - 800mg/m² + citocina arabinosídeo 800 - 1600mg/m² + melfalano 140mg/m²
 Melfalano: 200 mg/m²

Regimes de condicionamento para TCTH-alo

Mieloablatoivo (MAC) - causa intensa citopenia irreversível e requer o implante da célula-tronco. No Hospital Amaral Carvalho, são considerados MAC quando for aplicada a dose de bussulfano > 8 mg/kg e/ou de TBI ≥ 8 Gy.

O sistema imune transplantado pode reconhecer antígenos de histocompatibilidade menores e antígenos de células tumorais, o que promove o efeito GvT, mas aumenta as chances para o surgimento de DECH mais precoce e mais intenso.

Bu(ev)-Cy: bussulfano 12,8mg/kg + ciclofosfamida 120mg/kg
 Flu + Bu (ev): fludarabina 120 -180mg/kg + bussulfano 12,8mg/kg (ev)
 Flu + Bu + ATG: fludarabina 120 -180mg/kg + bussulfano 12,8mg/kg (ev) + globulina antitímócito 4,5 a 6mg/kg
 Flu + Bu + TBI: fludarabina 120 -180mg/kg + bussulfano 12,8mg/kg (ev) + irradiação corporal total 12Gy
 Flu + TBI: fludarabina 120 -180mg/kg + irradiação corporal total 12Gy
 Flu + TBI + ATG: fludarabina 120 -180mg/kg + irradiação corporal total 8-12Gy + globulina antitímócito 4,5 a 6mg/kg
 TBI + VP: irradiação corporal total 12Gy + etoposide 40 a 60mg/kg +
 TBI + VP + ATG: irradiação corporal total 12Gy + etoposide 40 a 60mg/kg + globulina antitímócito 4,5 a 6mg/kg
 TBI + Cy + ATG: irradiação corporal total 12Gy + ciclofosfamida 120mg/kg + globulina antitímócito 4,5 a 6mg/kg
 TBI + Cy : irradiação corporal total 12 Gy + ciclofosfamida 120mg/kg

Não mieloblatoivo (NMA) - causa citopenia mínima e pode inclusive ser aplicado sem o suporte da célula-tronco.

Com intensidade reduzida (RIC) - intermediário entre MAC e NMA, podem causar citopenias de duração variável, reversível ou não, e necessitam do implante da célula-tronco. Normalmente são aplicados em indivíduos mais velhos ou com comorbidades ou ainda que tenham sido submetidos ao TCTH-auto previamente.

Esses dois regimes não possuem, teoricamente, efeito GvT, porém podem propiciar maior quantidade do linfócito T ef do doador. Normalmente são regimes indicados para doenças em completa remissão ou que tenham um comportamento clínico mais indolente. No presente estudo, nenhum paciente recebeu regime de condicionamento tipo NMA.

Flu + Mel: fludarabina 120 a 150mg/m² + melfalano 140 mg/m²
 Flu + Bu (vo): fludarabina 150 -160 mg/kg + bussulfano (vo) 8mg/kg
 Flu + Mel + TBI: fludarabina 120 a 150mg/m² + melfalano 140mg/m² + irradiação corporal total 1-2Gy
 Flu + Mel + TBI + ATG: fludarabina 120 a 150mg/m² + melfalano 140mg/m² + irradiação corporal total 1-2Gy + globulina antitímócito 4,5 a 6mg/kg
 ATG + Mel: globulina antitímócito 4,5 a 6mg/kg + melfalano 140mg/m²
 Bu(ev)-Cy (tandem): Fase 1: fludarabina 120 a 150mg/m² + citarabina 8g/m² + mitoxantrone 40mg/m² Fase 2 : bussulfano 6,4mg/kg + ciclofosfamida 120mg/kg
 Mel + ATG (tandem): Fase 1: fludarabina 120 a 150mg/m² + citarabina 8g/m² + mitoxantrone 40mg/m² Fase 2 : melfalano 140mg/m² + globulina antitímócito 4,5 a 6mg/kg

Legendas: alo: alogênico; ATG: globulina antitímócito; auto: autólogo; Bu: bussulfano; Cy: ciclofosfamida; Flu: fludarabina; GvT (do inglês, graft-versus-tumor): enxerto versus tumor; Mel: melfalano; TBI (do inglês, total body irradiation): irradiação corporal total; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas; VP: veposide (ou etoposide)

Anexo F: Quadro 11. Tipos de TCTH e as características que condicionam as decisões na escolha para o tratamento das doenças

TCTH-auto: são utilizadas as próprias células-tronco do paciente	TCTH-alo: as células-tronco advém de um indivíduo saudável
Vantagens	Vantagens
Não há necessidade de tipagem HLA	Células-tronco não foram expostas à quimioterapia
Ausência de DECH	Células-tronco estão livres do tumor
Não há necessidade de supressão imune	Existe a atividade GvT (enxerto-contra-tumor)
Desvantagens	Desvantagens
Possibilidade de dano à célula-tronco	Disponibilidade de doador é incerta
Possibilidade de contaminação com célula tumoral	DECH
Ausência do efeito GvT	Risco maior para complicações
Alto risco para recaída	

Legendas: auto: autólogo; alo: alogênico; HLA: antígeno leucocitário humano. DECH: doença do enxerto-contra-hospedeiro; GvT (do inglês, graft-versus-tumor): enxerto-contra-hospedeiro

Fonte: Adaptado de Antin, Joseph H. Manual of Stem Cell and Bone Marrow Transplantation. Cambridge University Press⁽²⁴⁸⁾

Anexo G: Quadro 12. (parte 1) Citocinas - fontes e funções

Citocinas e subunidades	Fonte de células principais	Principais alvos celulares e efeitos biológicos
Membros da família de citocinas do tipo I		
Interleucina-2 (IL-2)	Células T	<p>Células T: proliferação e diferenciação em células efectoras e de memória; promove o desenvolvimento de células T regulatórias, a sobrevivência, e a função</p> <p>Células NK: proliferação, ativação</p> <p>Células B: proliferação, síntese de anticorpos (<i>in vitro</i>)</p>
Interleucina-4 (IL-4)	Células T CD4 ⁺ (Th2), mastócitos	Células B: isotipo mudando para IgE; células T: diferenciação Th-2, proliferação; macrófagos: ativação alternativa e inibição da ativação clássica mediada por IFN- γ ; mastócitos: proliferação (<i>in vitro</i>)
Interleucina-5 (IL-5)	Células TCD4 ⁺ (Th-2)	<p>Eosinófilos: ativação, geração aumentada</p> <p>Células B: proliferação, produção IgA (<i>in vitro</i>)</p>
Interleucina-6 (IL-6)	Macrófagos, células endoteliais, células T	Fígado: síntese de proteína de fase aguda; Células B: proliferação de células produtoras de anticorpos;
Interleucina-12 (IL-12)	Macrófagos, células dendríticas	Células T: diferenciação Th-1; células NK e células T: síntese de IFN- γ , atividade citotóxica aumentada
Interleucina-13 (IL-13)	Células T CD4 ⁺ (Th-2); células NKT, mastócitos	<p>Células B: isotipo mudando para IgE</p> <p>Células epiteliais: aumento de produção de muco</p> <p>Fibroblastos: aumento de síntese de colágeno</p> <p>Macrófagos: ativação alternativa</p>
Interleucina-17	Células T	<p>Células endoteliais: aumento de produção de quimiocina</p> <p>Macrófagos: aumento da produção de quimiocinas e citocina</p> <p>Células epiteliais: produção de GM-CSF e G-CSF</p>

Fonte: Quadro adaptado de Abbas et al. (2012)⁽²⁴⁹⁾

Anexo G: Quadro 13. (parte 2) Citocinas - fontes e funções

Citocinas e subunidades	Fonte de células principais	Principais alvos celulares e efeitos biológicos
Membros da família de citocinas do tipo I		
Fator estimulados de colônias (CSF) granulócito e monócito CSF (GM-CSF)	Células T, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Progenitores imaturos e comprometidos, macrófagos maduros: maturação induzida de granulócitos e monócitos, ativação de macrófagos
Membros da família de citocinas do tipo II		
Interleucina-10 (IL-10)	Macrófagos, células T (principalmente células T reguladoras)	Macrófagos, células dendríticas: inibição da expressão de IL-12, coestimuladoras e NHC de classe II
Interferon γ (IFN- γ)	Células T (células T Th1 CD8 ⁺), células NK	Macrófagos: ativação clássica (aumento das funções microbicidas) Células B: isótipos mudando para subclasses opsonizantes de IgG de fixação de complemento (estabelecidas em camundongos) Células T: diferenciação de Th1 Várias células: aumento de expressão de moléculas MHC de classe I e classe II aumento do processamento de antígeno e apresentação à células T
Superfamília de citocinas TNF*		
Fator de necrose tumoral (TNF)	Macrófagos, células NK células T	Células endoteliais: ativação (inflamação, coagulação) Neutrófilos: ativação Hipotálamo: febre Fígado: síntese de proteínas de fase aguda Músculo, gordura: catabolismo (caquexia)
Outras citocinas		
Fator de transformação de rescimento- β (TGF- β)	Células T (principalmente T regs), macrófagos, outros tipos de células	Células T: inibição da proliferação e funções efetoras; diferenciação de células Th-17 e T reg Células B: inibição da proliferação, produção de IgA Macrófagos: inibição da ativação, estímulo dos fatores angiogênicos Fibroblastos: aumento da síntese de colágeno

Fonte: Quadro adaptado de Abbas et al. (2012)⁽²⁴⁹⁾

Anexo H: Quadro 14. Principais características dos epítomos

Epítomos	Principal expressão celular
CD3	Células T, timócitos
CD4	Células T restritas MHC classe II; subconjuntos de timócitos, monócitos e macrófagos
CD8	Células T restritas MHC da classe I; subtipos de timócitos
CD19	A maioria das células B
CD56	Células T, células nervosas e NK
CD25	Células T e B ativadas; macrófagos ativados
CD127	Precursosores de linfócitos T da medula óssea
FoxP3	Proteína codificada pelo gene da família <i>forkhead</i> , de regulação transcricional
CD31	Plaquetas; monócitos; granulócitos; células B, eosinófilos; células endoteliais, linfócitos T <i>naive</i>
CD38	Linfócitos B iniciais e ativados, plasmócitos, linfócitos T ativados
HLA-DR	Linfócitos B, células dendríticas e macrófagos, linfócitos T ativados
CD45RO	células T de memória; subtipo de células B, monócitos, macrófagos
CD45RA	células T virgens (<i>naive</i>), células B, monócitos CD45RB: células B, subtipo de células T
CCR7	Receptor de quimiocina: migração de linfócitos T e células dendríticas
CCR6	Receptor de quimiocina: migração de células dendríticas e células T de memória
CxCR3	Receptor de quimiocinas: recrutamento de células T efectoras
CD34	Precursosores de células hematopoiéticas; células endoteliais em vênulas endoteliais altas
CD45	Células hematopoiéticas

Fonte: Quadro adaptado de Abbas et al. (2012)⁽²⁴⁹⁾ e NCBI - categoria proteína (PUBMED)⁽²⁵⁰⁾

Anexo I: Quadro 15. Representação das subpopulações T e das citocinas e sua relação com eventos de DECH-C

RESUMO DE UMA VISÃO GERAL (com alguns exemplos na literatura)				
Relação entre as subpopulações linfocitárias T e citocinas e eventos de DECH-C				
	Situação	Autor	País	Ano
Subpopulações de linfócitos T				
Linf T CD4 <i>naive</i>	Diminuído	Wysoczanska B	Polônia	2007
Linf T efet	Aumentado	Rangarajan H	EUA	2012
Linf T reg	Diminuído	León-Rodríguez E	México	2017
Citocinas				
IL-6	Aumentado	Chen X	Japão	2009
IL-10	Aumentado	Presland RB	EUA	2016
IL-17	Aumentado	Bejanyan N	EUA	2018
INF- γ	Aumentado	Mancusi A	Itália	2018
TNF- α	Aumentado	Monaco C	Reino Unido	2015
TGF- β	Aumentado	MacDonald KP	Austrália	2017

Legendas: DECH-C: doença do enxerto-contrá-hospedeiro crônica; efet.: efetor; IL: interleucina; INF: interferon; Linf.: linfócitos; reg.: regulador; TGF: fator de transformação do crescimento; TNF: fator de necrose tumoral

Anexo J: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

(Paciente ou Indivíduo – Adulto)

[este documento contém 3 (três) páginas]

Data: São Paulo,de.....de.....

Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa

Nome:.....
Documento de Identidade:..... Sexo: M..... ou F.....
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....Estado:.....
CEP:.....Telefone (s): DDD(.....):.....;(.....).....

Dados sobre a pesquisa

1. Título do protocolo de pesquisa: **AVALIAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA LINFÓIDE T APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE LEUCEMIA AGUDA OU MIELODISPLASIA**

Pesquisadores responsáveis:

1. Dra Clarisse Martins Machado
Cargo/Função: Chefe do Laboratório de Virologia do IMTSP
Unidade do HCFMUSP: Laboratório de Virologia (LIM 52)
2. Dra. Luiza Guilherme Guglielme
Cargo/Função: Vice diretora do laboratório de imunologia do InCor
Unidade do HCFMUSP: Laboratório de investigação médica (LIM-19)

2. Avaliação do Risco da Pesquisa: (Probabilidade de Dano Físico ou Psíquico com a Pesquisa)

Risco mínimo: **X (coleta de amostra de sangue)** Risco Médio (Intermediário): AUSENTE

Risco Baixo: AUSENTE

Risco Maior (Grande): AUSENTE

3. DURAÇÃO DA PESQUISA:Coleta de amostra de sangue: Somente durante o primeiro ano do transplante, em 5 (cinco) momentos diferentes.

O estudo com resultados, no entanto, somente estará concluído após 2 (dois) anos de pesquisa.

Li a primeira página deste documento de 3(três) páginas:.....(rubrica)

INFORMAÇÕES AO PACIENTE

1. **Objetivos da pesquisa:** Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa para avaliar como e quando a sua imunidade volta a funcionar depois do transplante de medula óssea.
2. **Justificativa da pesquisa:** Nesta pesquisa, vamos analisar alguns exames que mostram como está a recuperação da sua imunidade após a realização do transplante de medula. Os exames realizados poderão mostrar se existe risco maior para uma infecção grave ou mesmo para apresentar a Doença do Enxerto contra o Hospedeiro, conhecida como DECH. Assim, dependendo dos resultados, existe a possibilidade de, no futuro, os médicos iniciarem tratamentos mais cedo, ou até diminuir ou aumentar a dose dos medicamentos.
3. **Descrição dos procedimentos que serão realizados:** Na avaliação da recuperação imunológica: Será coletada 1(uma) amostra de 15 ml de sangue de sua veia em 5 (cinco) momentos diferentes durante o primeiro ano do transplante: (1º amostra): antes do transplante; ; (2º amostra): aos 3 meses do transplante; (3º amostra): aos 6 meses do transplante; (4º amostra): aos 9 meses do transplante; (5º amostra): aos 12 meses do transplante.
4. **Descrição dos desconfortos e riscos esperados:** O único desconforto ao participar deste estudo, será a picada da agulha no momento da coleta de sangue. Pode ser que apareça uma mancha roxa (hematoma) no local da picada. Esse desconforto não causará riscos a você.
5. **Benefícios para o participante:** Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para você. Porém, alguns dos exames que serão feitos nesse estudo, podem ajudar seu médico a fazer um tratamento melhor. Isso pode ajudar também outros pacientes que precisarem fazer transplante de medula no futuro.
6. **Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:** Não há nenhum procedimento alternativo vantajoso pelo qual o paciente poderá optar.
7. **Garantia de acesso ao estudo:** Em qualquer etapa (momento) da pesquisa, você poderá ter acesso ao profissional responsável pelo andamento da pesquisa para obter esclarecimento de eventuais dúvidas. O contato poderá ocorrer no setor de Transplantes de Medula Óssea do Hospital de Jaú, de segunda a quarta-feira, das 09:00h às 15:00h, diretamente ou através do telefone: (14-36021200 ramal 1332- Unidade de Citometria de Fluxo) para conversar com o médico Dr. Luis Klaus Alves da Rocha, CRM:106.890, responsável direto pelo bom andamento desta pesquisa.
8. **Garantia da saída do estudo:** É garantida a liberdade da retirada de seu consentimento a qualquer momento da pesquisa. Neste momento, você deixará de participar do estudo sem qualquer tipo de prejuízo ao seu tratamento ou acesso ao Hospital Amaral Carvalho.
9. **Direito de confidencialidade:** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os resultados de outros pacientes. Não será divulgada a identificação de nenhum paciente envolvido no estudo.
10. **Direito ao conhecimento do(s) resultado(s):** Você terá o direito de saber o(s) resultado(s) da pesquisa, parcial ou total, caso venha a desejar.
11. **Despesas e compensações:** Não há despesas pessoais para que você possa participar deste estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensações financeiras ou de qualquer outra natureza para que você aceite participar do presente estudo.
12. **Compromisso do pesquisador:** Os dados da pesquisa e as amostras coletadas (sangue) somente serão utilizados no presente estudo.

Li a segunda página deste documento de 3(três) páginas:.....(rubrica)

Concordância do paciente em participar da pesquisa: AVALIAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA LINFÓIDE T APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE LEUCEMIA AGUDA OU MIELODISPLASIA.

São Paulo,de.....de.....

Eu,.....RG:.....
 .discuti com o médico pesquisador Luis Klaus Alves da Rocha (CRM:106890) ou seu substituto sobre minha decisão em participar do presente estudo. Entendi perfeitamente os propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos e as garantias de confidencialidade e acesso aos dados da pesquisa. Está perfeitamente claro para mim que minha participação no presente estudo é isenta de despesas ou ganhos de qualquer natureza. Tenho pleno conhecimento de que terei acesso ao tratamento hospitalar sempre que for necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo intitulado “AVALIAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA LINFÓIDE T APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE LEUCEMIA AGUDA OU MIELODISPLASIA” e sei que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento da pesquisa, sem sofrer qualquer tipo de penalidade ou mesmo prejuízo ao meu tratamento médico por tal decisão.

Assinatura do paciente (ou seu responsável legal):

..... RG:.....

Declaro, para os devidos fins, que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do paciente:.....RG:..... Afirmo que o consentimento do paciente ou seu representante legal, bem como a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ocorreu através de amplo e irrestrito conhecimento, por parte do paciente, da pesquisa intitulada “AVALIAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA LINFÓIDE T APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE LEUCEMIA AGUDA OU MIELODISPLASIA”. Afirmo também que esta pesquisa está em acordo com os termos da lei no Brasil, principalmente, relacionados no Documento das Américas de Boas Práticas Clínicas, na Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde e na Resolução RDC 39/2008 da ANVISA.

Assinatura do pesquisador que esclareceu os objetivos da pesquisa e aplicou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao paciente (ou seu responsável legal):

..... RG:.....

Li a terceira página deste documento de 3(três) páginas:.....(rubrica)

8 REFERÊNCIAS

1. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957 Sep;257(11):491-6. PubMed PMID: 13464965.
2. Ende M. History of umbilical cord blood transplantation. *Lancet*. 1995 Oct;346(8983):1161. PubMed PMID: 7475621.
3. Körbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2011 Jun;117(24):6411-6. PubMed PMID: 21460243.
4. Voltarelli JC. Transplante de células-tronco hematopoéticas. 1ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2009.
5. D'Souza A, Fretham C. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR summary slides, 2017. Available at: <http://www.cibmtr.org>.
6. Henslee-Downey PJ. Allogeneic transplantation across major HLA barriers. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Dec;14(4):741-54. PubMed PMID: 11924919.
7. Montoro J, Sanz J, Sanz GF, Sanz MA. Advances in haploidentical stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2016 08;57(8):1766-75. PubMed PMID: 27424663. Epub 2016/04/13.
8. Petersdorf EW. Genetics of graft-versus-host disease: the major histocompatibility complex. *Blood Rev*. 2013 Jan;27(1):1-12. PubMed PMID: 23182478.
9. Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb;19(2). PubMed PMID: 29470425.
10. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007 Dec;110(13):4576-83. PubMed PMID: 17785583.
11. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Aug;13(8):965-74. PubMed PMID: 17640601.
12. Foeken LM, Green A, Hurley CK, Marry E, Wiegand T, Oudshoorn M, et al. Monitoring the international use of unrelated donors for transplantation: the WMDA annual reports. *Bone Marrow Transplant*. 2010 May;45(5):811-8. PubMed PMID: 20154736.

13. Eapen M, Le Rademacher J, Antin JH, Champlin RE, Carreras J, Fay J, et al. Effect of stem cell source on outcomes after unrelated donor transplantation in severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Sep;118(9):2618-21. PubMed PMID: 21677312. PMCID: PMC3167362.
14. Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood*. 2010 Mar;115(9):1843-9. PubMed PMID: 20029048.
15. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, Bacigalupo A, Bredeson CN, Bullorsky E, et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007 Aug;110(4):1397-400. PubMed PMID: 17475907.
16. Chu R, Brazauskas R, Kan F, Bashey A, Bredeson C, Camitta B, et al. Comparison of outcomes after transplantation of G-CSF-stimulated bone marrow grafts versus bone marrow or peripheral blood grafts from HLA-matched sibling donors for patients with severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Jul;17(7):1018-24. PubMed PMID: 21034842.
17. Woolfrey A, Lee SJ, Gooley TA, Malkki M, Martin PJ, Pagel JM, et al. HLA-allele matched unrelated donors compared to HLA-matched sibling donors: role of cell source and disease risk category. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Oct;16(10):1382-7. PubMed PMID: 20447462.
18. Norkin M, Wingard JR. Recent advances in hematopoietic stem cell transplantation. *F1000Res*. 2017;6:870. PubMed PMID: 28663793.
19. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2010 Nov;363(22):2091-101. PubMed PMID: 21105791.
20. Ariza-Heredia EJ, Nesher L, Chemaly RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett*. 2014 Jan;342(1):1-8. PubMed PMID: 24041869.
21. Norkin M, Wingard JR. Diagnostic strategies for invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013 Aug;11(8):941-9. PubMed PMID: 23946173.

22. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2007 Jan;356(4):335-47. PubMed PMID: 17251530.
23. Fuji S, Einsele H, Kapp M. Cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplant patients: current and future therapeutic options. *Curr Opin Infect Dis*. 2017 Aug;30(4):372-6. PubMed PMID: 28505028.
24. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010 May;115(19):3861-8. PubMed PMID: 20215642.
25. Remberger M, Törlén J, Ringdén O, Engström M, Watz E, Uhlin M, et al. Effect of Total Nucleated and CD34(+) Cell Dose on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 May;21(5):889-93. PubMed PMID: 25662230.
26. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:507. PubMed PMID: 27909435.
27. Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol*. 2008 Dec;30(4):425-37. PubMed PMID: 18949477.
28. Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Mar;35 Suppl 1:S53-7. PubMed PMID: 15812532.
29. Mackall C, Fry T, Gress R, Peggs K, Storek J, Toubert A, et al. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Oct;44(8):457-62. PubMed PMID: 19861978.
30. Haddad JJ. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct;297(4):700-13. PubMed PMID: 12359210.
31. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 2006 Jan;126(1):32-41. PubMed PMID: 16417215.
32. Hogquist KA, Xing Y, Hsu FC, Shapiro VS. T Cell Adolescence: Maturation Events Beyond Positive Selection. *J Immunol*. 2015 Aug;195(4):1351-7. PubMed PMID: 26254267.
33. Hazenberg MD, Verschuren MCM, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJM. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*. 2001 Nov;79(11):631-40. PubMed PMID: WOS:000172518700004.

34. Chiarini M, Zanotti C, Serana F, Sottini A, Bertoli D, Caimi L, et al. T-cell Receptor and K-deleting Recombination Excision Circles in Newborn Screening of T- and B-cell Defects: Review of the Literature and Future Challenges. *J Public Health Res.* 2013 Apr;2(1):9-16. PubMed PMID: 25170474.
35. Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens.* 2012 Feb;79(2):83-9. PubMed PMID: 22220718.
36. Cunningham CA, Helm EY, Fink PJ. Reinterpreting recent thymic emigrant function: defective or adaptive? *Curr Opin Immunol.* 2017 Dec;51:1-6. PubMed PMID: 29257954.
37. Saini C, Tarique M, Rai R, Siddiqui A, Khanna N, Sharma A. T helper cells in leprosy: An update. *Immunol Lett.* 2017 04;184:61-6. PubMed PMID: 28235552.
38. de Sousa JR, Sotto MN, Simões Quaresma JA. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. *Front Immunol.* 2017;8:1635. PubMed PMID: 29234318.
39. Zens KD, Connors T, Farber DL. Tissue compartmentalization of T cell responses during early life. *Semin Immunopathol.* 2017 Nov;39(6):593-604. PubMed PMID: 28894935.
40. Lee W, Lee GR. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp Mol Med.* 2018 Mar;50(3):e456. PubMed PMID: 29520112.
41. Tao JH, Cheng M, Tang JP, Liu Q, Pan F, Li XP. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases. *Inflammation.* 2017 Feb;40(1):328-39. PubMed PMID: 27882473.
42. Nedoszytko B, Lange M, Sokołowska-Wojdyło M, Renke J, Trzonkowski P, Sobjanek M, et al. The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part II: The Treg role in skin diseases pathogenesis. *Postepy Dermatol Alergol.* 2017 Oct;34(5):405-17. PubMed PMID: 29507554.
43. Perales MA, van den Brink MR. Immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: is it time to revisit how patients are monitored? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Nov;18(11):1617-9. PubMed PMID: 23022468.
44. Hassan MN, Waller EK. GVHD clears the Aire in thymic selection. *Blood.* 2015 Apr;125(17):2593-5. PubMed PMID: 25907903.
45. Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I. Acute Graft. *Anticancer Res.* 2017 04;37(4):1547-55. PubMed PMID: 28373413.

46. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2017 Jan;129(1):30-7. PubMed PMID: 27821503.
47. Cho SY, Lee HJ, Lee DG. Infectious complications after hematopoietic stem cell transplantation: current status and future perspectives in Korea. *Korean J Intern Med*. 2018 Mar;33(2):256-76. PubMed PMID: 29506345.
48. Heinz WJ, Buchheidt D, Christopeit M, von Lilienfeld-Toal M, Cornely OA, Einsele H, et al. Diagnosis and empirical treatment of fever of unknown origin (FUO) in adult neutropenic patients: guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann Hematol*. 2017 Nov;96(11):1775-92. PubMed PMID: 28856437.
49. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, McMannis J, Rosinski S, McNiece I, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood*. 2007 Dec;110(13):4543-51. PubMed PMID: 17671230.
50. Atilla E, Atilla PA, Toprak SK, Demirer T. A review of late complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Clin Transplant*. 2017 Oct;31(10). PubMed PMID: 28753218.
51. Gea-Banacloche J, Komanduri KV, Carpenter P, Paczesny S, Sarantopoulos S, Young JA, et al. National Institutes of Health Hematopoietic Cell Transplantation Late Effects Initiative: The Immune Dysregulation and Pathobiology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Jun;23(6):870-81. PubMed PMID: 27751936.
52. Ge Q, Zhao Y. Evolution of thymus organogenesis. *Dev Comp Immunol*. 2013 2013 Jan-Feb;39(1-2):85-90. PubMed PMID: 22266420.
53. Ferrando-Martinez S, De Pablo-Bernal RS, De Luna-Romero M, De Ory SJ, Genebat M, Pacheco YM, et al. Thymic Function Failure Is Associated With Human Immunodeficiency Virus Disease Progression. *Clin Infect Dis*. 2017 05;64(9):1191-7. PubMed PMID: 28158588.
54. Gaballa A, Sundin M, Stikvoort A, Abumaree M, Uzunel M, Sairafi D, et al. T Cell Receptor Excision Circle (TREC) Monitoring after Allogeneic Stem Cell Transplantation; a Predictive Marker for Complications and Clinical Outcome. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct;17(10). PubMed PMID: 27727179.
55. Borghans JA, Bredius RG, Hazenberg MD, Roelofs H, Jol-van der Zijde EC, Heidt J, et al. Early determinants of long-term T-cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency. *Blood*. 2006 Jul;108(2):763-9. PubMed PMID: 16822903.

56. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, ET al. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 5:649-655, 1982. PubMed PMID:7165009.
57. Setor Biologia Molecular. Técnica para coloração dos marcadores de superfície celular. Jaú: Hospital Amaral Carvalho; 2018.
58. BD PharmigenTM. Technical data sheet. PE Mouse anti-Human FoxP3. Material Number, 560046: Alternate Name: Scurfin, IPEX, JM2. Disponível em: <http://www.bdbiosciences.com>. EUA; 2011.
59. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb;12(3):191-200. PubMed PMID: 22343568.
60. Boldt A, Borte S, Fricke S, Kentouche K, Emmrich F, Borte M, et al. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014 May;86(3):191-206. PubMed PMID: 24488780.
61. Bio-plex. Bio-plex Pro Human Inflammation and TGF β assays. Instruction Manual. Bio-rad®, 2017.
62. Mitchell BI, Byron MM, Ng RC, Chow DC, Ndhlovu LC, Shikuma MC. Elevation of Non-Classical (CD14+/lowCD16++) Monocytes Is Associated with Increased Albuminuria and Urine TGF- β 1 in HIV-Infected Individuals on Stable Antiretroviral Therapy. *PLoS One*. 2016; 11(4): e0153758. PubMed PMID:27097224.
63. QIamp: QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 3rd ed. QIAGEN®; 2012.
64. Thermo Fisher Scientific. Assessment of Nucleic Acid Purity. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. Disponível em: <http://www.nanodrop.com>. Wilmington, Delaware USA, 2016.
65. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
66. MyTRECKit: MyTREC Real-Time qPCR Assay Kit Technical Manual. Geneplus®, 2017.
67. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974; 18:295-304. PubMed PMID: 4153799.

68. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, 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*. 2015 Mar 21(3): 389-401.e1. PubMed PMCID: PMC4329079.
69. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2017 01;129(1):30-7. PubMed PMID: 27821503.
70. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.
71. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. 2a ed. New York: Wiley; 2000.
72. Fine JP, Gray R J. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *JASA* 1999; 94:496-509.
73. Kleinbaum DG. *Survival analysis: a self-learning text*. 1st ed. New York: Springer; 1996.
74. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2nd ed. New York: Chapman and Hall. 1989.
75. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models*. 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996.
76. Wu T, Young JS, Johnston H, Ni X, Deng R, Racine J, et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 2013 Jul;191(1):488-99. PubMed PMID: 23709681.
77. Taub DD, Longo DL. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev*. 2005 Jun;205:72-93. PubMed PMID: 15882346.
78. Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanickolas R, et al. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med*. 1999 Sep;190(5):725-32. PubMed PMID: 10477556.
79. Gaballa A, Sundin M, Stikvoort A, Abumaree M, Uzunel M, Sairafi D, et al. T Cell Receptor Excision Circle (TREC) Monitoring after Allogeneic Stem Cell Transplantation; a Predictive Marker for Complications and Clinical Outcome. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct;17(10). PubMed PMID: 27727179.
80. Gaballa A, Norberg A, Stikvoort A, Mattsson J, Sundberg B, Uzunel M, et al. Assessment of TREC, KREC and telomere length in long-term survivors after allogeneic HSCT: the role of GvHD and graft source and evidence for telomere

- homeostasis in young recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Oct. PubMed PMID: 28991250.
81. Svaldi M, Lanthaler AJ, Dugas M, Lohse P, Pescosta N, Straka C, et al. T-cell receptor excision circles: a novel prognostic parameter for the outcome of transplantation in multiple myeloma patients. *Br J Haematol*. 2003 Sep;122(5):795-801. PubMed PMID: 12930391.
 82. Poulin JF, Sylvestre M, Champagne P, Dion ML, Kettaf N, Dumont A, et al. Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2003 Dec;102(13):4600-7. PubMed PMID: 12933579.
 83. Clave E, Lisini D, Douay C, Giorgiani G, Busson M, Zecca M, et al. Thymic function recovery after unrelated donor cord blood or T-cell depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation correlates with leukemia relapse. *Front Immunol*. 2013;4:54. PubMed PMID: 23459761.
 84. Steffens CM, Al-Harthi L, Shott S, Yogev R, Landay A. Evaluation of thymopoiesis using T cell receptor excision circles (TRECs): differential correlation between adult and pediatric TRECs and naïve phenotypes. *Clin Immunol*. 2000 Nov;97(2):95-101. PubMed PMID: 11027449.
 85. Geenen V, Poulin JF, Dion ML, Martens H, Castermans E, I Hansenne, et al. Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J Endocrinol*. 2003 Mar;176(3):305-11. PubMed PMID: 12630915.
 86. Naylor K, Li GJ, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *Journal of Immunology*. 2005 Jun;174(11):7446-52. PubMed PMID: WOS:000229298400109.
 87. Cho S, Ge J, Seo SB, Kim K, Lee HY, Lee SD. Age estimation via quantification of signal-joint T cell receptor excision circles in Koreans. *Leg Med (Tokyo)*. 2014 May;16(3):135-8. PubMed PMID: 24524944.
 88. Serana F, Airò P, Chiarini M, Zanotti C, Scarsi M, Frassi M, et al. Thymic and bone marrow output in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2011 Aug;31(4):540-9. PubMed PMID: 21491094.
 89. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998 Dec;396(6712):690-5. PubMed PMID: 9872319.

90. Morgun A, Shulzhenko N, Socorro-Silva A, Diniz RV, Almeida DR, Gerbase-Delima M. T cell receptor excision circles (TRECs) in relation to acute cardiac allograft rejection. *J Clin Immunol*. 2004 Nov;24(6):612-6. PubMed PMID: 15622445.
91. Cho S, Seo HJ, Lee JH, Kim MY, Lee SD. Influence of immunologic status on age prediction using signal joint T cell receptor excision circles. *Int J Legal Med*. 2017 Jul;131(4):1061-7. PubMed PMID: 28144748.
92. Li Y, Yin Q, Yang L, Chen S, Geng S, Wu X, et al. Reduced levels of recent thymic emigrants in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Jul;58(7):1047-55. PubMed PMID: 19018534.
93. Sun DP, Wang L, Ding CY, Liang JH, Zhu HY, Wu YJ, et al. Investigating Factors Associated with Thymic Regeneration after Chemotherapy in Patients with Lymphoma. *Front Immunol*. 2016;7:654. PubMed PMID: 28082988.
94. Haining WN, Neuberg DS, Kecskemethy HL, Evans JW, Rivoli S, Gelman R, et al. Antigen-specific T-cell memory is preserved in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005 Sep;106(5):1749-54. PubMed PMID: 15920008.
95. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Feb;21(2):266-74. PubMed PMID: 25445023.
96. Carlens S, Ringdén O, Remberger M, Lönnqvist B, Hägglund H, Klaesson S, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Oct;22(8):755-61. PubMed PMID: 9827972.
97. Luger S, Sacks N. Bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome--who? when? and which? *Bone Marrow Transplant*. 2002 Aug;30(4):199-206. PubMed PMID: 12203135.
98. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*. 2001 Oct;98(7):2043-51. PubMed PMID: 11567988.
99. Arora M, Klein JP, Weisdorf DJ, Hassebroek A, Flowers ME, Cutler CS, et al. Chronic GVHD risk score: a Center for International Blood and Marrow Transplant Research analysis. *Blood*. 2011 Jun;117(24):6714-20. PubMed PMID: 21493797.

100. Remberger M, Beelen DW, Fauser A, Basara N, Basu O, Ringdén O. Increased risk of extensive chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood*. 2005 Jan;105(2):548-51. PubMed PMID: 15367429.
101. Ringdén O, Labopin M, Bacigalupo A, Arcese W, Schaefer UW, Willemze R, et al. Transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA-identical siblings in adult patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2002 Dec;20(24):4655-64. PubMed PMID: 12488410.
102. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2012 Oct;367(16):1487-96. PubMed PMID: 23075175.
103. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2009 Sep;10(9):855-64. PubMed PMID: 19695955.
104. Malladi RK, Peniket AJ, Littlewood TJ, Towlson KE, Pearce R, Yin J, et al. Alemtuzumab markedly reduces chronic GVHD without affecting overall survival in reduced-intensity conditioning sibling allo-SCT for adults with AML. *Bone Marrow Transplant*. 2009 May;43(9):709-15. PubMed PMID: 19029965.
105. Styczynski J, Tridello G, Gil L, Ljungman P, Hoek J, Iacobelli S, et al. Impact of Donor Epstein-Barr Virus Serostatus on the Incidence of Graft-Versus-Host Disease in Patients With Acute Leukemia After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation: A Study From the Acute Leukemia and Infectious Diseases Working Parties of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*. 2016 Jul;34(19):2212-20. PubMed PMID: 27091716.
106. Walker I, Panzarella T, Couban S, Couture F, Devins G, Elemary M, et al. Pretreatment with anti-thymocyte globulin versus no anti-thymocyte globulin in patients with haematological malignancies undergoing haematopoietic cell transplantation from unrelated donors: a randomised, controlled, open-label, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2016 Feb;17(2):164-73. PubMed PMID: 26723083.
107. Couban S, Aljurf M, Lachance S, Walker I, Toze C, Rubinger M, et al. Erratum to "Filgrastim-Stimulated Bone Marrow Compared with Filgrastim-Mobilized Peripheral Blood in Myeloablative Sibling Allografting for Patients with Hematologic Malignancies: A Randomized Canadian Blood and Marrow Transplant Group Study" [*Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22:1410-1415]. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Mar;23(3):534. PubMed PMID: 27789277.

108. Couban S, Aljurf M, Lachance S, Walker I, Toze C, Rubinger M, et al. Filgrastim-Stimulated Bone Marrow Compared with Filgrastim-Mobilized Peripheral Blood in Myeloablative Sibling Allografting for Patients with Hematologic Malignancies: A Randomized Canadian Blood and Marrow Transplant Group Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 08;22(8):1410-5. PubMed PMID: 27154847.
109. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar;117(11):3214-9. PubMed PMID: 21263156.
110. Punatar S, Gupta A, Gawande J, Bagal B, Mathew L, Kannan S, et al. Chronic Graft Versus Host Disease in Acute Leukemia Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant: Analysis of Risk Factors, Pattern and Long Term Outcome. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2016 Mar;32(1):32-8. PubMed PMID: 26855504.
111. Clave E, Rocha V, Talvensaari K, Busson M, Douay C, Appert ML, et al. Prognostic value of pretransplantation host thymic function in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2005 Mar;105(6):2608-13. PubMed PMID: 15546951.
112. Center for International Blood & Marrow Transplant Research. CIBMTR Forms Instruction Manual: Q234-406: Chronic Graft vs. Host Disease (GVHD). 2018. Disponível em: <https://www.cibmtr.org/manuals/fim/1/en/topic/getting-started>
113. Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I. Acute Graft. *Anticancer Res*. 2017 04;37(4):1547-55. PubMed PMID: 28373413.
114. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med*. 1986 Mar;314(12):729-35. PubMed PMID: 3513012.
115. Storb R, Deeg HJ, Farewell V, Doney K, Appelbaum F, Beatty P, et al. Marrow transplantation for severe aplastic anemia: methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1986 Jul;68(1):119-25. PubMed PMID: 3521761.
116. Chao NJ, Schmidt GM, Niland JC, Amylon MD, Dagis AC, Long GD, et al. Cyclosporine, methotrexate, and prednisone compared with cyclosporine and prednisone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1993 Oct;329(17):1225-30. PubMed PMID: 8413388.
117. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M, Paul M, Raanani P, Shpilberg O. Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Apr;43(8):643-53. PubMed PMID: 18997826.

118. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Feb;23(2):211-34. PubMed PMID: 27713092.
119. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:507. PubMed PMID: 27909435.
120. Deeg HJ, Sandmaier BM. Who is fit for allogeneic transplantation? *Blood*. 2010 Dec;116(23):4762-70. PubMed PMID: 20702782.
121. Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Feb;35(3):225-31. PubMed PMID: 15558041.
122. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1387-94. PubMed PMID: 17410187.
123. Storek J, Mohty M, Boelens JJ. Rabbit anti-T cell globulin in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jun;21(6):959-70. PubMed PMID: 25482864.
124. Ruutu T, Gratwohl A, de Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Feb;49(2):168-73. PubMed PMID: 23892326.
125. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Oct;17(10):2844-53. PubMed PMID: 16914538.
126. Arai Y, Jo T, Matsui H, Kondo T, Takaori-Kondo A. Efficacy of antithymocyte globulin for allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2017 Aug;58(8):1840-8. PubMed PMID: 27951736.
127. Champlin RE, Perez WS, Passweg JR, Klein JP, Camitta BM, Gluckman E, et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: a randomized controlled study of conditioning regimens. *Blood*. 2007 May;109(10):4582-5. PubMed PMID: 17272503.
128. Kröger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2016 Jan;374(1):43-53. PubMed PMID: 26735993.

129. Eyrich M, Wollny G, Tzaribashev N, Dietz K, Brügger D, Bader P, et al. Onset of thymic recovery and plateau of thymic output are differentially regulated after stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Mar;11(3):194-205. PubMed PMID: 15744238.
130. Jiménez M, Martínez C, Ercilla G, Carreras E, Urbano-Ispízu A, Aymerich M, et al. Clinical factors influencing T-cell receptor excision circle (TRECs) counts following allogeneic stem cell transplantation in adults. *Transpl Immunol*. 2006 Jun;16(1):52-9. PubMed PMID: 16701177.
131. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001 Mar;97(5):1458-66. PubMed PMID: WOS:000167117500039.
132. Wils EJ, van der Holt B, Broers AE, Posthumus-van Sluijs SJ, Gratama JW, Braakman E, et al. Insufficient recovery of thymopoiesis predicts for opportunistic infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*. 2011 Dec;96(12):1846-54. PubMed PMID: 21859737.
133. Lewin SR, Heller G, Zhang L, Rodrigues E, Skulsky E, van den Brink MR, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood*. 2002 Sep;100(6):2235-42. PubMed PMID: 12200390.
134. Chen X, Barfield R, Benaim E, Leung W, Knowles J, Lawrence D, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood*. 2005 Jan;105(2):886-93. PubMed PMID: 15358630.
135. Wilson K, Duque DR, Murphy MS, Hawken S, Pham-Huy A, Kwong J, et al. T-cell receptor excision circle levels and safety of paediatric immunization: A population-based self-controlled case series analysis. *Hum Vaccin Immunother*. 2018 Feb;1-14. PubMed PMID: 29420131.
136. Müller L, Pawelec G. Aging and immunity - impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun*. 2014 Jul;39:8-22. PubMed PMID: 24315935.
137. Aversa F, Prezioso L, Manfra I, Galaverna F, Spolzino A, Monti A. Immunity to Infections after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):e2016057. PubMed PMID: 27872737.
138. Cho SY, Lee HJ, Lee DG. Infectious complications after hematopoietic stem cell transplantation: current status and future perspectives in Korea. *Korean J Intern Med*. 2018 Mar;33(2):256-76. PubMed PMID: 29506345.

139. Saglio F, Cena S, Berger M, Quarello P, Boccasavia V, Ferrando F, et al. Association between thymic function and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome: results of a pediatric study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jun;21(6):1099-105. PubMed PMID: 25708218.
140. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Dec;11(12):945-56. PubMed PMID: 16338616.
141. Schultz KR, Miklos DB, Fowler D, Cooke K, Shizuru J, Zorn E, et al. Toward biomarkers for chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Feb;12(2):126-37. PubMed PMID: 16443511.
142. Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, Cooke KR, Lathrop J, Griffith LM, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 May;21(5):780-92. PubMed PMID: 25644957.
143. Yu J, Storer BE, Kushekhar K, Abu Zaid M, Zhang Q, Gafken PR, et al. Biomarker Panel for Chronic Graft-Versus-Host Disease. *J Clin Oncol*. 2016 Aug;34(22):2583-90. PubMed PMID: 27217465.
144. Lamarthée B, Malard F, Gamonet C, Bossard C, Couturier M, Renauld JC, et al. Donor interleukin-22 and host type I interferon signaling pathway participate in intestinal graft-versus-host disease via STAT1 activation and CXCL10. *Mucosal Immunol*. 2016 Mar;9(2):309-21. PubMed PMID: 26153763.
145. Kariminia A, Holtan SG, Ivison S, Rozmus J, Hebert MJ, Martin PJ, et al. Heterogeneity of chronic graft-versus-host disease biomarkers: association with CXCL10 and CXCR3+ NK cells. *Blood*. 2016 06;127(24):3082-91. PubMed PMID: 27020088.
146. Abu Zaid M, Wu J, Wu C, Logan BR, Yu J, Cutler C, et al. Plasma biomarkers of risk for death in a multicenter phase 3 trial with uniform transplant characteristics post-allogeneic HCT. *Blood*. 2017 01;129(2):162-70. PubMed PMID: 27827824.
147. Khandelwal P, Lane A, Chaturvedi V, Owsley E, Davies SM, Marmer D, et al. Peripheral Blood CD38 Bright CD8+ Effector Memory T Cells Predict Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jul;21(7):1215-22. PubMed PMID: 25881755.

148. Rozmus J, Schultz KR, Wynne K, Kariminia A, Satyanarayana P, Krailo M, et al. Early and late extensive chronic graft-versus-host disease in children is characterized by different Th1/Th2 cytokine profiles: findings of the Children's Oncology Group Study ASCT0031. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Dec;17(12):1804-13. PubMed PMID: 21669298.
149. Wysoczanska B, Bogunia-Kubik K, Dlubek D, Jaskula E, Sok A, Drabczak-Skrzypek D, et al. Association with the presence of naive T cells in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic human stem cell transplantation and the lower incidence of chronic graft-versus host disease and relapse. *Transplant Proc*. 2007 Nov;39(9):2898-901. PubMed PMID: 18022011.
150. Pidala J, Sigdel TK, Wang A, Hsieh S, Inamoto Y, Martin PJ, et al. A combined biomarker and clinical panel for chronic graft versus host disease diagnosis. *J Pathol Clin Res*. 2017 Jan;3(1):3-16. PubMed PMID: 28138397.
151. Ahmed SS, Wang XN, Norden J, Pearce K, El-Gezawy E, Atarod S, et al. Identification and validation of biomarkers associated with acute and chronic graft versus host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Dec;50(12):1563-71. PubMed PMID: 26367225.
152. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Cutler CS, Bhuiya NS, Schowalter M, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Apr;113(16):3865-74. PubMed PMID: 19168788.
153. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009 May;373(9674):1550-61. PubMed PMID: 19282026.
154. Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1992 Dec;80(12):2964-8. PubMed PMID: 1467511.
155. Levine JE. Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol*. 2011 May;93(5):571-7. PubMed PMID: 21384095.
156. Kayaba H, Hirokawa M, Watanabe A, Saitoh N, Changhao C, Yamada Y, et al. Serum markers of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul;106(1 Pt 2):S40-4. PubMed PMID: 10887332.
157. Sfrikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:180-210. PubMed PMID: 20173395.
158. Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol*. 2015 Jan;27(1):55-62. PubMed PMID: 25411043.

159. León-Rodríguez E, Rivera-Franco MM, Gómez-Martín D, Romo-Tena J, Juárez-Vega G, Merayo-Chalico J, et al. Differential T cell subsets and cytokine profile between steady-state and G-CSF-primed bone marrow and its association with graft-versus-host disease. *Leuk Res.* 2017 Dec;63:47-52. PubMed PMID: 29101827.
160. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood.* 2011 Apr;117(14):3921-8. PubMed PMID: 21292771.
161. Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M, et al. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood.* 2009 Jul;114(4):891-900. PubMed PMID: 19491393.
162. Zhao D, Young JS, Chen YH, Shen E, Yi T, Todorov I, et al. Alloimmune response results in expansion of autoreactive donor CD4⁺ T cells in transplants that can mediate chronic graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2011 Jan;186(2):856-68. PubMed PMID: 21149609.
163. Rangarajan H, Yassai M, Subramanian H, Komorowski R, Whitaker M, Gorski J, et al. Emergence of T cells that recognize nonpolymorphic antigens during graft-versus-host disease. *Blood.* 2012 Jun;119(26):6354-64. PubMed PMID: 22496151.
164. Brüggem MC, Klein I, Greinix H, Bauer W, Kuzmina Z, Rabitsch W, et al. Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease. *Blood.* 2014 Jan;123(2):290-9. PubMed PMID: 24255916.
165. Presland RB. Biology of chronic graft: Immune mechanisms and progress in biomarker discovery. *World J Transplant.* 2016 Dec;6(4):608-19. PubMed PMID: 28058210.
166. MacDonald KP, Blazar BR, Hill GR. Cytokine mediators of chronic graft-versus-host disease. *J Clin Invest.* 2017 Jun;127(7):2452-63. PubMed PMID: 28665299.
167. Bejanyan N, Brunstein CG, Cao Q, Lazaryan A, Luo X, Curtsinger J, et al. Delayed immune reconstitution after allogeneic transplantation increases the risks of mortality and chronic GVHD. *Blood Adv.* 2018 Apr;2(8):909-22. PubMed PMID: 29678809.
168. Mancusi A, Piccinelli S, Velardi A, Pierini A. The Effect of TNF- α on Regulatory T Cell Function in Graft-versus-Host Disease. *Front Immunol.* 2018;9:356. PubMed PMID: 29541073.

169. Pillai MR, Collison LW, Wang X, Finkelstein D, Rehg JE, Boyd K, et al. The plasticity of regulatory T cell function. *J Immunol.* 2011 Nov;187(10):4987-97. PubMed PMID: 22013112.
170. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med.* 2003 Sep;9(9):1144-50.
171. Malard F, Bossard C, Brissot E, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, et al. Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Apr;49(4):539-44. PubMed PMID: 24419519.
172. Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y, et al. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood.* 2012 Jan;119(1):285-95. PubMed PMID: 22077062.
173. Barak V, Levi-Schaffer F, Nisman B, Nagler A. Cytokine dysregulation in chronic graft versus host disease. *Leuk Lymphoma.* 1995 Mar;17(1-2):169-73. PubMed PMID: 7773155.
174. Li Q, Zhai Z, Xu X, Shen Y, Zhang A, Sun Z, et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res.* 2010 Sep;34(9):1158-68. PubMed PMID: 20409584.
175. Kuzmina Z, Greinix HT, Weigl R, Körmöczi U, Rottal A, Frantal S, et al. Significant differences in B-cell subpopulations characterize patients with chronic graft-versus-host disease-associated dysgammaglobulinemia. *Blood.* 2011 Feb;117(7):2265-74. PubMed PMID: 21063025.
176. Imanguli MM, Swaim WD, League SC, Gress RE, Pavletic SZ, Hakim FT. Increased T-bet+ cytotoxic effectors and type I interferon-mediated processes in chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa. *Blood.* 2009 Apr;113(15):3620-30. PubMed PMID: 19168793.
177. Hayashida JN, Nakamura S, Toyoshima T, Moriyama M, Sasaki M, Kawamura E, et al. Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Jan;48(1):115-23. PubMed PMID: 22659679.
178. Mancusi A, Piccinelli S, Velardi A, Pierini A. The Effect of TNF- α on Regulatory T Cell Function in Graft-versus-Host Disease. *Front Immunol.* 2018;9:356. PubMed PMID: 29541073. PMCID: PMC5835761.

179. Kuzmina Z, Eder S, Böhm A, Pernicka E, Vormittag L, Kalhs P, et al. Significantly worse survival of patients with NIH-defined chronic graft-versus-host disease and thrombocytopenia or progressive onset type: results of a prospective study. *Leukemia*. 2012 Apr;26(4):746-56. PubMed PMID: 21926960.
180. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2005 Oct;106(8):2903-11. PubMed PMID: 15972448.
181. Perz JB, Gürel S, Schonland SO, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P. CD4+CD25highCD127low regulatory T cells in peripheral blood are not an independent factor for chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:606839. PubMed PMID: 22666141.
182. Allen JL, Tata PV, Fore MS, Wooten J, Rudra S, Deal AM, et al. Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. *Blood*. 2014 Mar;123(13):2108-15. PubMed PMID: 24532806.
183. Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*. 2004 Apr;20(4):441-53. PubMed PMID: 15084273.
184. Greinix HT, Kuzmina Z, Weigl R, Körmöcz U, Rottal A, Wolff D, et al. CD19+CD21low B cells and CD4+CD45RA+CD31+ T cells correlate with first diagnosis of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Feb;21(2):250-8. PubMed PMID: 25460358.
185. Huenecke S, Cappel C, Esser R, Pfirrmann V, Salzmann-Manrique E, Betz S, et al. Development of Three Different NK Cell Subpopulations during Immune Reconstitution after Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prognostic Markers in GvHD and Viral Infections. *Front Immunol*. 2017;8:109. PubMed PMID: 28239380.
186. Bohmann EM, Fehn U, Holler B, Weber D, Holler E, Herr W, et al. Altered immune reconstitution of B and T cells precedes the onset of clinical symptoms of chronic graft-versus-host disease and is influenced by the type of onset. *Ann Hematol*. 2017 Feb;96(2):299-310. PubMed PMID: 27942862.
187. Luznik L, Bolaños-Meade J, Zahurak M, Chen AR, Smith BD, Brodsky R, et al. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood*. 2010 Apr;115(16):3224-30. PubMed PMID: 20124511.

188. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014 Jul;124(3):374-84. PubMed PMID: 24914139.
189. Socié G, Schmoor C, Bethge WA, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, et al. Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-Fresenius. *Blood*. 2011 Jun;117(23):6375-82. PubMed PMID: 21467544.
190. Kanakry CG, Tsai HL, Bolaños-Meade J, Smith BD, Gojo I, Kanakry JA, et al. Single-agent GVHD prophylaxis with posttransplantation cyclophosphamide after myeloablative, HLA-matched BMT for AML, ALL, and MDS. *Blood*. 2014 Dec;124(25):3817-27. PubMed PMID: 25316679.
191. Frassoni F. Anti-T-cell globulin: an essential ingredient for haematopoietic cell transplantation? *Lancet Oncol*. 2009 Sep;10(9):839. PubMed PMID: 19695957.
192. Kumar A, Mhaskar AR, Reljic T, Mhaskar RS, Kharfan-Dabaja MA, Anasetti C, et al. Antithymocyte globulin for acute-graft-versus-host-disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review. *Leukemia*. 2012 Apr;26(4):582-8. PubMed PMID: 22182922.
193. Luznik L, O'Donnell PV, Fuchs EJ. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Semin Oncol*. 2012 Dec;39(6):683-93. PubMed PMID: 23206845.
194. Anderson BE, McNiff J, Yan J, Doyle H, Mamula M, Shlomchik MJ, et al. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(1):101-8. PubMed PMID: 12840064.
195. Bleakley M, Heimfeld S, Loeb KR, Jones LA, Chaney C, Seropian S, et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts. *J Clin Invest*. 2015 Jul;125(7):2677-89. PubMed PMID: 26053664.
196. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991 Mar;324(10):667-74. PubMed PMID: 1994250.
197. Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Wysoczanska B, Lange A. Recipient interferon-gamma 3/3 genotype contributes to the development of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005 Mar;90(3):425-6. PubMed PMID: 15749687.
198. Murphy WJ, Welniak LA, Taub DD, Wiltrout RH, Taylor PA, Vallera DA, et al. Differential effects of the absence of interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Clin Invest*. 1998 Nov;102(9):1742-8. PubMed PMID: 9802888.

199. Blazar B, White ES, Couriel D. Understanding chronic GVHD from different angles. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Jan;18(1 Suppl):S184-8. PubMed PMID: 22226105.
200. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May;441(7090):235-8. PubMed PMID: 16648838.
201. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32. PubMed PMID: 16200070.
202. Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007 Nov;110(10):3804-13. PubMed PMID: 17693581.
203. Iclozan C, Yu Y, Liu C, Liang Y, Yi T, Anasetti C, et al. T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Feb;16(2):170-8. PubMed PMID: 19804837.
204. Mauermann N, Burian J, von Garnier C, Dirnhofer S, Germano D, Schuett C, et al. Interferon-gamma regulates idiopathic pneumonia syndrome, a Th17+CD4+ T-cell-mediated graft-versus-host disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Aug;178(4):379-88. PubMed PMID: 18511701.
205. Radojcic V, Pletneva MA, Yen HR, Ivcevic S, Panoskaltsis-Mortari A, Gilliam AC, et al. STAT3 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of chronic sclerodermatous graft-versus-host disease in a murine model. *J Immunol*. 2010 Jan;184(2):764-74. PubMed PMID: 19995899.
206. Okamoto S, Fujiwara H, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, et al. Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft-versus-host disease via suppression of IFN- γ /IL-17-producing cells. *J Immunol*. 2015 Feb;194(3):1357-63. PubMed PMID: 25527789.
207. Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, et al. Programmed death-1 pathway in host tissues ameliorates Th17/Th1-mediated experimental chronic graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2014 Sep;193(5):2565-73. PubMed PMID: 25080485.
208. Dander E, Balduzzi A, Zappa G, Lucchini G, Perseghin P, André V, et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2009 Dec;88(11):1261-72. PubMed PMID: 19996925.

209. Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I, et al. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2008 Sep;112(5):2101-10. PubMed PMID: 18596226.
210. Hechinger AK, Smith BA, Flynn R, Hanke K, McDonald-Hyman C, Taylor PA, et al. Therapeutic activity of multiple common γ -chain cytokine inhibition in acute and chronic GVHD. *Blood*. 2015 Jan;125(3):570-80. PubMed PMID: 25352130.
211. Flynn R, Du J, Veenstra RG, Reichenbach DK, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, et al. Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2014 Jun;123(25):3988-98. PubMed PMID: 24820310.
212. Pidala J, Bloom GC, Eschrich S, Sarwal M, Enkemann S, Betts BC, et al. Tolerance associated gene expression following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *PLoS One*. 2015;10(3):e0117001. PubMed PMID: 25774806.
213. Pidala J, Bloom GC, Enkemann S, Eschrich S, Lancaster J, Anasetti C. Biomarkers to discern transplantation tolerance after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jun;16(6):729-38. PubMed PMID: 19922809.
214. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*. 2014 Jun;14(6):377-91. PubMed PMID: 24830344.
215. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006 Aug;108(4):1291-7. PubMed PMID: 16627754.
216. Teshima T, Reddy P, Liu C, Williams D, Cooke KR, Ferrara JL. Impaired thymic negative selection causes autoimmune graft-versus-host disease. *Blood*. 2003 Jul;102(2):429-35. PubMed PMID: 12663438.
217. van den Brink MR, Moore E, Ferrara JL, Burakoff SJ. Graft-versus-host-disease-associated thymic damage results in the appearance of T cell clones with anti-host reactivity. *Transplantation*. 2000 Feb;69(3):446-9. PubMed PMID: 10706060.
218. Zhang Y, Hexner E, Frank D, Emerson SG. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2007 Sep;179(5):3305-14. PubMed PMID: 17709547.
219. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007 Feb;109(4):1756-64. PubMed PMID: 17032915.

-
220. Morohashi T, Ogasawara K, Kitaichi N, Iwabuchi K, Onoé K. Abrogation of negative selection by GVHR induced by minor histocompatibility antigens or H-2D antigen alone. *Immunobiology*. 2000 Sep;202(3):268-79. PubMed PMID: 11045662.
 221. Krenger W, Blazar BR, Holländer GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011 Jun;117(25):6768-76. PubMed PMID: 21427289.
 222. Miklos DB, Kim HT, Zorn E, Hochberg EP, Guo L, Mattes-Ritz A, et al. Antibody response to DBY minor histocompatibility antigen is induced after allogeneic stem cell transplantation and in healthy female donors. *Blood*. 2004 Jan;103(1):353-9. PubMed PMID: 14512314.
 223. Zorn E, Miklos DB, Floyd BH, Mattes-Ritz A, Guo L, Soiffer RJ, et al. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med*. 2004 Apr;199(8):1133-42. PubMed PMID: 15096539.
 224. Nakasone H, Tian L, Sahaf B, Kawase T, Schoenrock K, Perloff S, et al. Allogeneic HY antibodies detected 3 months after female-to-male HCT predict chronic GVHD and nonrelapse mortality in humans. *Blood*. 2015 May;125(20):3193-201. PubMed PMID: 25766725.
 225. Harless Smith S, Cancro MP. BLyS: the pivotal determinant of peripheral B cell selection and lifespan. *Curr Pharm Des*. 2003;9(23):1833-47. PubMed PMID: 12871188.
 226. Gunton JE, Sisavanh M, Stokes RA, Satin J, Satin LS, Zhang M, et al. Mice deficient in GEM GTPase show abnormal glucose homeostasis due to defects in beta-cell calcium handling. *PLoS One*. 2012;7(6):e39462. PubMed PMID: 22761801.
 227. Cancro MP. Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. *Nat Rev Immunol*. 2009 09;9(9):657-61. PubMed PMID: 19704418.
 228. Shlomchik MJ. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity*. 2008 Jan;28(1):18-28. PubMed PMID: 18199415.
 229. Badr G, Borhis G, Lefevre EA, Chaoul N, Deshayes F, Dessirier V, et al. BAFF enhances chemotaxis of primary human B cells: a particular synergy between BAFF and CXCL13 on memory B cells. *Blood*. 2008 Mar;111(5):2744-54. PubMed PMID: 18172003.
 230. de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, et al. CD24(hi)CD27⁺ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015 Mar;125(11):1830-9. PubMed PMID: 25605369.

231. Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2013 Apr;121(16):3274-83. PubMed PMID: 23422748.
232. Kuzmina Z, Greinix HT, Knobler R, Worel N, Kouba M, Weigl R, et al. Proportions of immature CD19+CD21- B lymphocytes predict the response to extracorporeal photopheresis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Jul;114(3):744-6. PubMed PMID: 19608761.
233. Thannickal VJ, Zhou Y, Gaggar A, Duncan SR. Fibrosis: ultimate and proximate causes. *J Clin Invest*. 2014 Nov;124(11):4673-7. PubMed PMID: 25365073.
234. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012 Jul;18(7):1028-40. PubMed PMID: 22772564.
235. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):349-61. PubMed PMID: 18437155.
236. Ariel A, Timor O. Hanging in the balance: endogenous anti-inflammatory mechanisms in tissue repair and fibrosis. *J Pathol*. 2013 Jan;229(2):250-63. PubMed PMID: 23007838.
237. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jun;36(6):1031-7. PubMed PMID: 15094118.
238. Strieter RM. What differentiates normal lung repair and fibrosis? Inflammation, resolution of repair, and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Apr;5(3):305-10. PubMed PMID: 18403324.
239. Yoshihara S, Yanik G, Cooke KR, Mineishi S. Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP), and other late-onset noninfectious pulmonary complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Jul;13(7):749-59. PubMed PMID: 17580252.
240. Yanik G, Cooke KR. The lung as a target organ of graft-versus-host disease. *Semin Hematol*. 2006 Jan;43(1):42-52. PubMed PMID: 16412788.
241. Baird K, Cooke K, Schultz KR. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) in children. *Pediatr Clin North Am*. 2010 Feb;57(1):297-322. PubMed PMID: 20307722.

-
242. Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M, et al. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Jul;114(4):891-900. PubMed PMID: 19491393.
243. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J Immunol*. 2002 Mar;168(6):3088-98. PubMed PMID: 11884483.
244. Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Shlomchik MJ, Shlomchik WD. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. *J Immunol*. 2004 Nov;173(9):5467-75. PubMed PMID: 15494494.
245. Jacobsen ED, Cutler C. Acute and chronic graft-versus-host disease. *Hospital Physician Board Review Manual*. 2009. 3(1):1-12.
246. Lee SJ, Wolff D, Kitko C, Koreth J, Inamoto Y, Jagasia M, et al. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: IV. The 2014 Response Criteria Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jun;21(6):984-99. PubMed PMID: 25796139.
247. Clinical performance status. CIBMTR, 2018. Disponível em: <https://www.cibmtr.org/DataManagement/TrainingReference/Manuals/DataManagement/Documents/appendix-l.pdf>.
248. Antin JH; Raley DY. Manual of stem cell and bone marrow transplantation. 2th. New York: Cambrigde University Press; 2013.
249. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
250. NCBI. Resources. Protein. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.