

Mariana Nassif Kerbaux

**RECUPERAÇÃO IMUNE GLOBAL E CITOMEGALOVÍRUS-ESPECÍFICA
PÓS-TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA UTILIZANDO
DIFERENTES TIPOS DE IMUNOSSUPRESSÃO**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

São Paulo

2024

Mariana Nassif Kerbaux

**RECUPERAÇÃO IMUNE GLOBAL E CITOMEGALOVÍRUS-ESPECÍFICA
PÓS-TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA UTILIZANDO
DIFERENTES TIPOS DE IMUNOSSUPRESSÃO**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Hamerschlak
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Cavalheiro Marti

São Paulo

2024

Kerbaudy, Mariana Nassif

Recuperação imune global e citomegalovírus-específica pós-transplante alogênico de medula óssea utilizando diferentes tipos de imunossupressão / Mariana Nassif Kerbaudy. -- São Paulo, 2024.
xv, 85 f.

Tese (Doutorado) - Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Global and cytomegalovirus-specific immune recovery post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using different types of immunosuppression.*

1. Ciclofosfamida. 2. Infecções por citomegalovírus. 3. Transplante de células-tronco. 4. Viroses. 5. Reconstituição imune.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Mariana Nassif Kerbaux

**RECUPERAÇÃO IMUNE GLOBAL E CITOMEGALOVÍRUS-ESPECÍFICA
PÓS-TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA UTILIZANDO
DIFERENTES TIPOS DE IMUNOSSUPRESSÃO**

Presidente da banca: Prof. Dr. Nelson Hamerschlag

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

Prof. Dr. Luis Fernando Aranha Camargo

Prof. Dr. Vanderson Geraldo Rocha

Membros suplentes:

Dr. Fabio Pires de Sousa Santos

Dra. Raquel de Melo Alves Paiva

Aprovada em: 11/04/2024.

Dedicatória

Aos meus pais, Alberto Barbante Kerbaux e Marilena Tomaleri Nassif Kerbaux, que sempre estiveram ao meu lado em todos os desafios que enfrentei. Nunca deixaram de acreditar em mim, me ensinaram, defenderam e aconselharam. Sempre foram meus maiores exemplos de caráter, bondade, perseverança e humildade.

Ao meu filho, Daniel Kerbaux Daun, que me acompanhou desde a barriga durante a realização de grande parte dos experimentos dessa pesquisa e me ensinou sobre o mais puro e verdadeiro amor.

Agradecimentos

Primeiramente, ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson Hamerschlag, que além de ser meu mentor na hematologia e transplante de medula óssea, também aceitou me orientar nesse desafio. Exímio pesquisador, médico e ser humano, com o qual aprendi e aprendo todos os dias muito além de pesquisa e medicina, mas principalmente sobre responsabilidade, humildade, dedicação e cuidado com o ser humano na sua forma mais profunda.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Luciana Cavalheiro Marti, que, juntamente com toda sua equipe, em especial a Dra. Fernanda Agostini, me ensinaram sobre diversas e diferentes técnicas de laboratório e análise de dados, sempre com muita paciência e não poupando tempo e atenção para me ajudar a atingir meus resultados e objetivos.

À Dra. Andreza Ribeiro, minha mentora na medicina, hematologia e transplante de medula óssea, grande incentivadora do meu crescimento.

Ao colega Pinaki Banerjee, exímio pesquisador do Md Anderson Cancer Center, Houston, Texas, que me auxiliou com análises complementares do estudo, deixando-o mais consistente e robusto.

À minha irmã, Lucila Nassif Kerbaux, que além de parceira de vida, também tenho a sorte de tê-la como parceira na minha especialidade, com quem divido angústias, problemas, alegrias e tristezas todos os dias da minha vida.

Aos meus pais, Alberto Barbante Kerbaux e Marilena Tomaleri Nassif Kerbaux, maiores incentivadores e exemplos que eu poderia ter.

Ao meu esposo, Leandro Galvão Daun, grande companheiro de vida, que me encoraja a sempre procurar minha melhor versão, compreendeu minha ausência em diversas noites e finais de semana durante esse caminho e torna todos os meus dias mais leves, felizes e completos.

À toda equipe médica e multiprofissional da hematologia e transplante de medula óssea do Hospital Israelita Albert Einstein, meus colegas de trabalho e grandes amigos, que garantem o sucesso do cuidado a esse paciente tão complexo e desafiador e tornam os dias mais leves tanto para os pacientes quanto para nós.

Aos pacientes, que confiaram em mim durante seu tratamento e que também aceitaram participar do presente estudo. Com eles, aprendo diariamente o real sentido da vida.

Ao Amigo H, que financiou a compra dos reagentes, viabilizando a realização desse estudo.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas	1
1.2 Impacto do uso do timoglobulina no transplante alogênico	2
1.3 Uso da ciclofosfamida pós-transplante como estratégia de imunossupressão.....	3
1.4 Transplante de células-tronco hematopoiéticas e citomegalovírus	8
1.5 Reconstituição imune pós-transplante alogênico	10
1.6 Reconstituição imune no contexto de soroterapia como imunossupressão	14
1.7 Reconstituição imune no contexto de ciclofosfamida pós-transplante.....	15
1.8 Reconstituição imune citomegalovírus-específica	18
1.9 Objetivos.....	22
2 MÉTODOS	23
2.1 Declaração de ética.....	23
2.2 Desenho do estudo	23
2.3 Pacientes e local de coleta dos dados	23
2.4 Critérios de inclusão e exclusão	24
2.5 Protocolo de estudo.....	24
2.6 Protocolo de tratamento utilizado e definições	25
2.7 Obtenção de amostra	27
2.8 Processamento e congelamento de amostra	27
2.9 <i>Enzyme-linked immune absorbent spot</i>	29
2.10 Descrição do ensaio	29
2.11 Citometria de fluxo.....	31
2.11.1 Protocolo para marcação de anticorpos para citometria.....	31
2.12 Desfechos estudados	34
2.13 Análise estatística.....	35

3 RESULTADOS	36
3.1 População.....	36
3.2 Desfecho primário	38
3.3 Recuperação imunológica por citometria.....	38
3.4 Análise de resposta citomegalovírus–específica.....	56
3.5 Desfechos secundários	57
3.5.1 Resultados clínicos do transplante	57
3.5.2 Doença do enxerto contra hospedeiro.....	58
3.5.3 Mortalidade não relacionada a recaída.....	60
3.5.4 Mortalidade relacionada a recaída	61
3.5.5 Sobrevida global.....	62
3.5.6 Reativação viral	63
3.5.7 Análise de desfechos clínicos com relação a reconstituição imune	65
4 DISCUSSÃO	66
5 CONCLUSÕES	75
6 REFERÊNCIAS	77
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Demonstração da reconstituição imune pós-transplante	12
Figura 2. Solução de sangue e PBS e Ficoll.....	27
Figura 3. Camadas após centrifugação	28
Figura 4. Técnica de ELISpot	31
Figura 5. Análise dos painéis de populações.....	39
Figura 6. Análise dos painéis de memórias	40
Figura 7. Distribuição de granulócitos, linfócitos, monócitos e linfócitos T, B e NK	42
Figura 8. Perfil de linfócitos T, B e NK nos dias +30, +60, +90 e +180.....	43
Figura 9. Distribuição das populações linfócitos T, B e NK e monócitos em números absolutos nos dias pré-TMO, +30, +60, +90 e +180	44
Figura 10. Distribuição das populações de linfócitos T, B, NK em números absolutos por profilaxia utilizada nos dias pré-TMO, +30, +60, +90 e +180	45
Figura 11. Casos de citometria de pacientes que utilizaram ciclofosfamida ou ATG nos dias +30 e +180.....	46
Figura 12. Análise através da plataforma Cytobank de dois pacientes que utilizaram ciclofosfamida ou ATG no dia +30.....	47
Figura 13. Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos grupos ATG e Ciclofosfamida.....	48
Figura 14. Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos grupos ATG e Ciclofosfamida em números absolutos	49
Figura 15. Casos de citometria de perfil de linfócitos T de pacientes que receberam PTCy ou ATG nos D+30 e D+180	51
Figura 16. Perfil de linfócitos T CD4 ⁺ <i>naïve</i> , transição e memória e linfócitos T CD8 ⁺ <i>naïve</i> , transição e memória nos grupos ATG e PTCy pré-transplante e nos dias +30, +60, +90 e +180 pós-infusão	52
Figura 17. Grupos de células da plataforma Cytobank mostrando diferenças entre 2 pacientes, um que recebeu globulina antitimocítica (ATG) e outro que recebeu ciclofosfamida pós-transplante, em relação aos marcadores de células T nos dias +30, +60, +90	53
Figura 18. Subtipos de células NK pós-transplante	55
Figura 19. Subtipos de células T e NK pós-transplante	56
Figura 20. Resposta ao citomegalovírus	57

Figura 21. Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda graus II a IV.....	58
Figura 22. Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda graus III a IV.....	59
Figura 23. Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica	60
Figura 24. Mortalidade relacionada ao transplante.....	61
Figura 25. Mortalidade relacionada a recaída.....	62
Figura 26. Sobrevida global	63
Figura 27. Reativação de citomegalovírus.....	64

Lista de tabelas

Tabela 1. Painel de anticorpos de populações e memórias	32
Tabela 2. Classificação dos subtipos de linfócitos T de acordo com sua expressão	33
Tabela 3. Especificações de anticorpos utilizados	33
Tabela 4. Características dos pacientes incluídos	36
Tabela 5. Perfil de células linfomononucleares	41
Tabela 6. Perfil de linfócitos T	47
Tabela 7. Subtipos de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	50
Tabela 8. Subtipos de células NK pós-transplante.....	54
Tabela 9. Resposta citomegalovírus-específica.....	57

Lista de abreviaturas

ATG	Timoglobulina
AUC	Área total sob a curva
BKV	Poliomavírus
CIBMTR	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
CMV	Citomegalovírus
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DHL	Desidrogenase láctica
EBMT	<i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>
EBV	<i>Epstein-Barr-virus</i>
ECIL	Conferência Europeia de Infecções em Leucemia
ELISpot	<i>IFN-gamma Enzyme-Linked ImmunoSpot</i>
HHV-6	Herpes vírus tipo 6
KIRs	<i>Killer Ig-like receptors</i>
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
MAT	Microangiopatia trombótica
MMF	Micofenolato mofetil
MTX	Metotrexato
NK	<i>Natural killer</i>
PTCy	Ciclofosfamida pós-transplante
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SLC	Síndrome de liberação de citocina
SMD	Síndrome mielodisplásica
TBI	Irradiação corporal total
TCR	Receptores de células T
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TMI	Irradiação medular total

Resumo

Introdução: Nos últimos anos, foram desenvolvidas novas formas de imunossupressão no transplante alogênico de medula óssea, como o uso da ciclofosfamida pós-transplante, responsável pelo sucesso do transplante haploidêntico de medula óssea. A ciclofosfamida vem também sendo utilizada no transplante compatível, com resultados promissores com relação à incidência de doença do enxerto contra hospedeiro. Entretanto, dados sobre reconstituição imune com esse tipo de imunossupressão foram pouco estudados até o momento. A reconstituição imune está diretamente envolvida com a morbimortalidade pós-transplante, estando relacionada a reativações e infecções virais, como, principalmente, o citomegalovírus. **Objetivos:** Avaliar a reconstituição imune global e citomegalovírus-específica em pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea no contexto de transplante não aparentado, utilizando timoglobulina no regime de condicionamento ou ciclofosfamida pós-transplante. **Métodos:** Estudo prospectivo em que foram incluídos pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea não aparentado com uso de timoglobulina ou uso de ciclofosfamida pós-transplante. Foram coletados dados clínicos e demográficos dos pacientes e sangue periférico para análise de recuperação imune global e citomegalovírus-específica nos dias +30, +60, +90, +180. As análises de reconstituição imune foram realizadas por citometria de fluxo e recuperação citomegalovírus-específica por técnica de ELISpot. **Resultados:** Foram incluídos 36 pacientes nesse estudo, no período de 10 de janeiro de 2019 a 1 de maio de 2021, sendo 20 no Grupo Timoglobulina e 16 no Grupo Ciclofosfamida. Com relação aos desfechos clínicos, foram observadas altas taxas de enxertia neutrofílica em ambos os grupos, porém a enxertia neutrofílica foi mais precoce com timoglobulina (mediana de 12 dias), comparado a ciclofosfamida (mediana de 16 dias) ($p=0,0001$). Não houve diferença entre os grupos com relação a tempo de internação, reativação de citomegalovírus que ocorreu em 70% do Grupo ATG, em mediana de 33,5 dias e 75% do Grupo Ciclofosfamida ($p=0,98$), em mediana de 34 dias, doença do enxerto contra o hospedeiro aguda graus II a IV e doença do enxerto contra o hospedeiro crônico, bem como em sobrevida global e mortalidade relacionada ao transplante ou mortalidade relacionada à recaída. Com relação à reconstituição imune, precocemente pós-transplante, no D+30, no Grupo Timoglobulina, quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida, houve maior número de linfócitos T, B e NK, além

de células NK CD56^{high}, CD56^{dim} e CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos}. Porém, no D+180, ocorreu uma inversão nos linfócitos B, com maior número no Grupo Ciclofosfamida. No D+60 e no D+90, no Grupo Timoglobulina, houve maior número de células CD56^{dim} quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida, já no D+180, no Grupo Ciclofosfamida, houve maior número de células NK CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos}. Além disso, foi encontrada população de linfócitos T duplo positivos CD4 e CD8, com predomínio no Grupo Ciclofosfamida no D+180. Quando avaliados ambos os grupos conjuntamente, a contagem de células CD4⁺ *naïve* (HR 1,04 IC 95% 1-1,09 p=0,047), CD4⁺ de transição (HR 1,04 IC 95% 1,01-1,07 p=0,012) e CD8⁺ *naïve* (HR 1 IC 95% 1-1,01 p=0,026) no D+60 foram fatores de risco para doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e maior quantidade de células CD4⁺ de memória no D+180 (HR 1,01 IC 95% 1-1,02 p=0,014) foi fator de risco para doença do enxerto contra o hospedeiro crônica. **Conclusões:** No contexto de transplante alogênico não aparentado, a imunossupressão com timoglobulina se relacionou com maior número de linfócitos T, B e NK no D+30, porém menor contagem de linfócitos B no D+180, além de maior quantidade de linfócitos NK CD56^{dim} nos D+60 e D+90. Imunossupressão com ciclofosfamida se relacionou a maior população de linfócitos T duplo positivos CD4 e CD8 e maior número de células NK CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos} no D+180. Além disso, maior número de células CD4⁺ *naïve*, CD4⁺ de transição e CD8⁺ *naïve* no D+60 foram fatores de risco para doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e maior quantidade de células CD4⁺ de memória no D+180 foi fator de risco para doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.

Descritores: Ciclofosfamida; Infecções por citomegalovirus; Transplante de células-tronco; Virose; Reconstituição imune

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas

O uso do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico é uma opção potencialmente curativa para diversas doenças, incluindo doenças hematológicas malignas como leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia linfóide aguda (LLA), síndrome mielodisplásica (SMD), linfomas e doenças não-malignas como falências medulares, hemoglobinopatias, imunodeficiências primárias e doenças metabólicas genéticas. O uso do TCTH continua a crescer em todo o mundo, desde a primeira descrição de TCTH realizado em humanos, por Donald Thomas, em 1957, com mais de 65.000 TCTHs realizados em todo mundo anualmente e mais de 1.000.000 de transplantes realizados até o ano de 2013.⁽¹⁾ No Brasil, há 127 centros de transplantes reconhecidos pelo Ministério da Saúde, sendo que 80 realizam transplante alogênico aparentado e 60 realizam transplante alogênico não aparentado. Entre 2008 e 2019, 7.264 transplantes foram reportados ao *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR) por 24 centros, representando um aumento do número de casos nos últimos anos, sendo 1073 reportados só em 2019. Entre os transplantes alogênicos, quase metade (49,7%) são de doadores aparentados e 28,9% correspondem a transplante com doador não aparentado.⁽²⁾ Publicação multicêntrica brasileira recente com pacientes com LLA submetidos a transplante alogênico de 2007 a 2017, demonstrou que doador aparentado compatível foi utilizado em 53%, doador não aparentado em 19%, doador com *mismatch* em 9% e haploidêntico em 19%. Nesse estudo, idade do paciente, idade do doador e status da doença pre transplante foram fatores associados a sobrevida global e sobrevida livre de leucemia.⁽³⁾

O transplante alogênico aparentado está relacionado a melhor reconstituição imune e melhores desfechos clínicos, entretanto, uma vez que a chance de encontrar um irmão HLA-idêntico é de 25% para cada irmão e o número de irmãos reduziu expressivamente nos últimos anos, o uso de doadores alternativos vem crescendo em todo o mundo, como o uso de doadores não aparentados 100% compatível ou com *mismatch*, membros da família que compartilhavam apenas um haplótipo HLA (transplante haploidêntico).⁽⁴⁾ Historicamente, o uso de inibidor de calcineurina associado a metotrexato (MTX) representa a forma tradicional de

imunossupressão no TCTH, entretanto, no transplante não aparentado, as taxas de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda e crônica com esse regime giram em torno de 30 a 50% e 30 a 70%, respectivamente.^(5,6) Assim, estratégias adicionais de imunossupressão são necessárias, sendo a timoglobulina (ATG) associada ao inibidor de calcineurina e MTX a forma de imunossupressão tradicional nesse tipo de transplante.

1.2 Impacto do uso do timoglobulina no transplante alogênico

Alguns estudos avaliaram o impacto do uso do ATG como terapia imunossupressora. Um desses estudos randomizou 109 pacientes com neoplasias hematológicas, submetidos a transplante alogênico não aparentado, em 2 estudos consecutivos: 54 participantes não receberam ATG enquanto 29 receberam ATG 7,5mg/Kg e, no outro estudo, 28 pacientes não receberam ATG e 27 receberam ATG 15mg/Kg. No 1º estudo, não houve diferença na incidência de DECH aguda graus II-IV, enquanto, no 2º, essa incidência foi de 50 *versus* 11% ($p=0,001$), porém com maior incidência de infecções letais (30 *versus* 7% $p=0,02$). Pacientes que não receberam ATG apresentaram, com maior frequência, DECH crônico extenso (62 *versus* 39% $p=0,04$).⁽⁷⁾ Posteriormente, com o aumento de seguimento, o uso de ATG correlacionou com menor incidência de disfunção pulmonar crônica (51 *versus* 19% $p=0,005$) e DECH crônico extenso (41 *versus* 15% $p=0,01$), além de melhora na qualidade de vida dos pacientes, com *performance status*, avaliado pelo *score* de Karnofsky, maior ou igual a 90% em 4 anos em 57% no braço controle e 89% no braço que recebeu ATG.⁽⁸⁾

Um estudo prospectivo, randomizado, fase III, incluiu 254 pacientes de 27 centros, entre 18 e 65 anos com leucemia aguda ou SMD, submetidos a transplante alogênico não aparentado com condicionamento mieloablativo e que foram randomizados entre ATG 20mg/Kg nos dias D-3, -2 e -1 ou placebo em adição a *tacrolimus* e *metotrexate* como profilaxia de DECH, com DECH crônica como desfecho primário do estudo. Nesse estudo, houve redução de DECH aguda graus 2 a 4 (23 *versus* 40%; $p=0,004$) e DECH crônica moderada a grave (12 *versus* 33% $p<0,001$) com ATG, porém sem diferença em sobrevida livre de DECH crônica moderada a grave entre ATG e placebo (sobrevida estimada em 2 anos de 48 *versus* 44% $p=0,47$). Além disso, sobrevida livre de progressão e sobrevida global foram inferiores no braço que recebeu ATG.⁽⁹⁾

Uma preocupação com o uso de ATG é o aumento do risco de recaída devido à depleção de linfócitos T. Nesse contexto, um estudo realizado em 234 pacientes do registro *European Society for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) portadores de LMA, submetidos a transplante alogênico aparentado receberam condicionamento de intensidade reduzida combinado com ATG em doses altas ($\geq 6\text{mg/Kg}$) ou em doses baixas ($< 6\text{mg/Kg}$), e nenhuma destas duas condições alterou a incidência cumulativa de DECH aguda ou crônica. Porém doses mais altas de ATG aumentaram significativamente a incidência de recaída da doença de base (52 *versus* 26%, $p=0,001$), levando a piores desfechos em sobrevida livre de progressão de doença e sobrevida global, além de sobrevida livre de DECH e recaída.⁽¹⁰⁾

Uma metanálise que avaliou a eficácia do ATG, com inclusão de 6 estudos clínicos com total de 845 pacientes, encontrou menor incidência de DECH aguda e crônica com a utilização de ATG, não havendo diferença em sobrevida global, recaída da doença de base ou mortalidade não relacionada a recaída, entretanto, a incidência de reativação de citomegalovírus (CMV) e *Epstein-Barr virus* (EBV) foram superiores.⁽¹¹⁾

Em estudo do nosso grupo, realizado com dados secundários do CIBMTR, que avaliou o impacto do ATG em transplante aparentado ou não aparentado compatível com pacientes de idade igual ou superior a 40 anos que realizaram transplante entre 2008 e 2017, com fonte sangue periférico, o ATG se relacionou com menor chance de DECH aguda graus II-IV e DECH crônica e menor mortalidade não relacionada a recaída, porém, com maior chance de recaída, especialmente se utilizado condicionamento de intensidade reduzida ou não mieloablativo com ATG.⁽¹²⁾

1.3 Uso da ciclofosfamida pós-transplante como estratégia de imunossupressão

O transplante haploidêntico vem aumentando nos últimos anos, principalmente após 2008, quando o grupo do hospital de John Hopkins, liderado por Efraim Fuchs, consolidou o uso de ciclofosfamida, um agente antineoplásico altamente imunossupressor, como terapia imunossupressora pós-transplante para depleção de células T *in vivo*.⁽¹³⁾ A ciclofosfamida é uma agente alquilante metabolizado no citocromo hepático P450 em fosforamida e acroleína, a qual previne a divisão celular através da ligação cruzada de cadeias de DNA, sendo que células em rápida divisão celular são mais susceptíveis a ação da ciclofosfamida. Essa medicação pode ser utilizada após a

infusão de células-tronco hematopoiéticas no TCTH porque essas células são resistentes a ação da ciclofosfamida por serem ricas em aldeído desidrogenase, enzima necessária para conversão da mostarda fosforamida em seu metabólito inativo.⁽¹⁴⁾

Uso da ciclofosfamida pós-transplante é relativamente simples, barata e facilmente reprodutível, eliminando a necessidade de técnicas caras de depleção de células T. Essa estratégia, quando comparada ao transplante haploidêntico com depleção *in vitro* tem melhores resultados relacionados a complicações infecciosas,⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ além disso, parece que transplante repleto de células T preserva imunidade antiviral e permite uma recuperação mais rápida das células T CD4⁺, o que poderia explicar as menores taxas de infecções virais.⁽¹⁷⁾

O transplante haploidêntico com utilização de ciclofosfamida pós-transplante no contexto de condicionamento não-mieloablativo demonstrou resultados clínicos bastante animadores, com incidência de DECH aguda graus II e IV até dia 200 pós-transplante de 34% e DECH crônica graus III e IV de apenas 6%, conforme publicado por Luznik et al.⁽¹³⁾ Posteriormente, também foram publicados resultados do uso de ciclofosfamida pós-transplante no contexto de transplante haploidêntico com regime de condicionamento mieloablativo, em que 50 pacientes com neoplasias hematológicas de alto risco foram submetidos a condicionamento contendo tiotepa, bussulfano e fludarabina, com ciclofosfamida nos dias +3 e +5. A incidência cumulativa de DECH aguda graus II e III foi de 12% e DECH crônica moderado de 10%.⁽¹⁸⁾

Uma metanálise realizada por nosso grupo e publicada em 2021, comparando regime de condicionamento mieloablativo *versus* regime de intensidade reduzida e fonte sangue periférico *versus* fonte medula óssea no transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante mostrou que a fonte sangue periférico se relacionou com menor chance de recaída e maiores taxas de DECH agudo e crônico, além de maior chance de enxertia com fonte periférica. Condicionamento mieloablativo, comparado ao regime de intensidade reduzida, se associou com menor chance de recaída, maior mortalidade não relacionada a recaída, e maior sobrevida livre de progressão.⁽¹⁹⁾ Outra publicação do nosso grupo avaliou fatores de risco para desfechos adversos no transplante haploidêntico, identificando que utilizar a mãe como doadora foi fator de risco para pior sobrevida, enquanto uso de tacrolimus foi protetor para DECH aguda e crônica.⁽²⁰⁾

Alguns estudos que compararam o transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós com outros tipos de transplante sem ciclofosfamida encontraram

menor incidência de DECH na primeira situação, como publicado pelo grupo do MD Anderson em 2015,⁽²¹⁾ em que pacientes com LMA foram submetidos a transplante haploidêntico ou não aparentado 8/8, com condicionamento mieloablativo ou intensidade reduzida. As incidências de DECH aguda graus 2 a 4 e de DECH crônico em 3 anos foram inferiores no transplante haploidêntico, sem diferença de sobrevida entre os grupos. Outro estudo, que comparou, em pacientes idosos (>60 anos) com SMD ou LMA, o transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante com alogênico aparentado ou não aparentado com regimes tradicionais de imunossupressão, não encontrou diferença com relação à sobrevida global e sobrevida livre de recaída entre os grupos, porém a incidência de DECH crônico moderado a grave foi menor no Grupo Haploidêntico com uso de ciclofosfamida em relação aos outros grupos.⁽²²⁾

Frente aos bons resultados encontrados com utilização da ciclofosfamida pós-transplante, principalmente relacionados a DECH crônica no transplante haploidêntico e, com a presunção natural de que a ciclofosfamida pode diminuir a DECH após o transplante compatível, ensaios testando a hipótese da utilização da ciclofosfamida no cenário de HLA compatível foram realizados. Recentemente, fizemos uma revisão da literatura sobre o uso da ciclofosfamida além do transplante haploidêntico,⁽²³⁾ com dados revisados explorados a seguir.

Em pacientes com LMA e LLA, a utilização de ciclofosfamida pós-transplante associada à micofenolato mofetil (MMF) e *tacrolimus* comparado a um grupo histórico que utilizou ATG, *tacrolimus*, MTX ou MMF, com uso de fonte periférica de enxerto, encontrou menores incidências de DECH aguda graus II a IV, DECH crônica, mortalidade não relacionada a recaída (16 *versus* 36%, $p=0,005$; HR, 0,55; IC 95%, 0,34 a 0,89) e melhores desfechos de sobrevida global (69 *versus* 40%, $p=0,0007$; HR, 0,43; IC 95%, 0,26 a 0,70) no grupo que recebeu ciclofosfamida.⁽²⁴⁾ Além disso, nesse estudo, foram encontradas menores taxas de doença veno-oclusiva hepática, reativação de CMV, mucosite grave e infecções fúngicas invasivas no Grupo da Ciclofosfamida.⁽²⁴⁾

Outro trabalho que comparou a utilização de ciclofosfamida pós-transplante com regime convencional de imunossupressão com ATG em pacientes submetidos a transplante alogênico não aparentado com 1 *mismatch* encontrou resultados semelhantes entre os grupos com relação a falência de enxertia medular, DECH crônico, recaída, sobrevida livre de progressão e sobrevida global, porém com menor incidência de DECH agudo graus II-IV nos primeiros 30 dias no Grupo da Ciclofosfamida (0 *versus* 15%, $p=0,001$). O tempo mediano para enxertia de neutrófilos

e plaquetas foi maior com o uso da ciclofosfamida.⁽²⁵⁾ Entretanto, há poucos dados sobre reconstituição imune após essas diferentes formas de imunossupressão pós-transplante.

Um estudo retrospectivo comparou, em pacientes com LMA, resultados de transplante alogênico aparentado ou não aparentado com o haploidêmico em 83 pacientes e não encontrou, em análise multivariada, efeito do tipo de doador nos desfechos de transplante, exceto por enxertia neutrofílica mais rápida nos transplantes com maior compatibilidade.⁽²⁶⁾

Nesse contexto, um trabalho recente, retrospectivo, comparou desfechos de 2.036 pacientes com leucemia aguda ou SMD, adultos, submetidos a transplante haploidêmico e 284 pacientes submetidos a transplante não aparentado, todos no contexto de ciclofosfamida pós-transplante. Entre os pacientes que receberam condicionamento de intensidade reduzida, taxas de falha de enxertia, DECH aguda graus II a IV e mortalidade não relacionada à recaída, foram menores com transplante não aparentado, assim, sobrevida global e sobrevida livre de doença foram superiores com transplante não aparentado. Entre os receptores de condicionamento mieloablativo, enxertia plaquetária em 100 dias foi superior e houve menores taxas de DECH aguda graus III e IV e DECH crônica em transplantes não aparentados, demonstrando mais uma vez, a importância da compatibilidade entre paciente e doador, quando utilizada a mesma plataforma de imunossupressão.⁽²⁷⁾ Porém, faltam dados de reconstituição imune e infecções nesses estudos.

Outro estudo recente, retrospectivo, comparou o transplante haploidêmico ao não aparentado com uma incompatibilidade, ambos no contexto de uso de ciclofosfamida pós-transplante, em pacientes com LMA em remissão completa, visto ser essa uma dúvida frequente na escolha do doador, na ausência de doador 100% compatível.⁽²⁸⁾ Os pacientes foram divididos em 3 grupos: não aparentado com uso de fonte periférica (n=155), haploidêmico com fonte medula óssea (n=647) e haploidêmico com fonte periférica (n=949). Nesse contexto, o transplante haploidêmico tanto com fonte medula ou sangue periférico, apresentou maior mortalidade não relacionada a recaída, menor sobrevida livre de leucemia e menor sobrevida global comparado ao não aparentado em análise multivariada. Outras variáveis independentemente associadas a sobrevida global e sobrevida livre de leucemia foram a intensidade do regime de condicionamento, idade no transplante e sorologia para CMV do paciente. O Grupo Haploidêmico com fonte medula óssea apresentou menores taxas de DECH aguda graus III-IV, sem diferença com significância estatística em DECH aguda graus II-IV ou DECH

crônica. As maiores taxas de mortalidade não relacionada a recaída no transplante haploidêntico e causas de morte indicam maior mortalidade relacionada a infecção no Grupo Haploidêntico, o que pode ser consequência de diversos fatores, como regime de condicionamento e imunossupressão e diferentes cinéticas de reconstituição imune no transplante haploidêntico e não aparentado, porém pela característica retrospectiva do estudo, esses dados não puderam ser analisados⁽²⁸⁾ e faltam dados na literatura sobre reconstituição imune, especialmente reconstituição CMV-específica, após essas diferentes formas de imunossupressão pós-transplante.

O estudo BMT CTN 1203⁽²⁹⁾ foi um estudo prospectivo, fase 2, com pacientes submetidos a transplante compatível com condicionamento de intensidade reduzida, em que foram comparadas 3 formas de imunossupressão: ciclofosfamida pós-transplante, *tacrolimus* e MMF, *tacrolimus*, MTX e bortezomibe ou *tacrolimus*, MTX e maraviroc e comparados com controle histórico que recebeu inibidor de calcineurina e MTX. Entre os 3 regimes, o regime com ciclofosfamida pós-transplante apresentou melhores resultados em sobrevida livre de DECH e recaída, sendo atualmente comparado a MTX e inibidor de calcineurina em estudo fase 3.

No contexto de regime de condicionamento mieloablativo, estudo fase 3 recente comparou 3 regimes de imunossupressão em pacientes com leucemia aguda ou SMD, com doador aparentado ou não aparentado: ciclofosfamida pós-transplante como agente único, com fonte medula óssea; seleção de células CD34⁺ *ex vivo*, sem nenhum inibidor de calcineurina, com fonte periférica; ou MTX/*tacrolimus* com fonte medula óssea. Não houve diferença com relação às taxas de sobrevida livre de DECH crônica e recaída em 2 anos nos 3 grupos. Ciclofosfamida pós como agente único foi associada a taxas semelhantes de DECH crônica e sobrevida global e tendência a menor recaída, quando comparado ao controle com MTX/*tacrolimus* (HR, 0,52; 0,28 a 0,96; p=0,037).⁽³⁰⁾

Outro estudo fase 2, conduzido na Universidade de Minnesota, avaliou uso de ciclofosfamida pós-transplante em pacientes submetidos a transplante compatível com condicionamento mieloablativo baseado em bussulfano ou TBI, com incidência de pacientes com DECH crônica com necessidade de imunossupressão de 5,5%, com sobrevida global em 2 anos de 73,7%, sem diferença em desfechos de sobrevida com relação a transplante compatível ou 7/8.⁽³¹⁾

Por fim, o estudo BMT CTN 1703, um estudo fase 3, em pacientes adultos com neoplasias hematológicas que foram submetidos a transplante alogênico

aparentado (n=128) ou não aparentado (n=288) compatíveis ou com *mismatch* (n=15), fonte sangue periférico que foram randomizados entre esquema contendo ciclofosfamida pós-transplante associado a *tacrolimus* e MMF ou esquema tradicional com *tacrolimus* e MTX, com condicionamento de intensidade reduzida. Em análise multivariada por regressão de COX, o uso de ciclofosfamida apresentou sobrevida livre de recaída e DECH em 1 ano de 52,7% comparado a 34,9% (p=0,001), sendo que essa diferença ocorreu por menor incidência de DECH aguda e crônica, sem diferença significativa com relação a recaída da doença de base ou sobrevida global em 1 ano pós-transplante. Como conclusão desse importante estudo fase 3, o autor sugere que o esquema de imunossupressão baseado em ciclofosfamida pós-transplante deve se tornar o padrão em transplantes compatíveis com esquema de condicionamento de intensidade reduzida.⁽³²⁾

1.4 Transplante de células-tronco hematopoiéticas e citomegalovírus

A reconstituição imune pós-transplante está diretamente relacionada a reativações e infecções virais, sendo principalmente representada pelo CMV, com importante impacto no aumento de morbimortalidade pós-transplante, reinternações hospitalares e aumento de custos do transplante.

A infecção primária por CMV ocorre via transmissão por saliva, contato sexual, aleitamento materno, transfusão de sangue ou transplante de órgãos. Após a infecção primária, o CMV persiste no hospedeiro, como infecção latente em determinados tipos celulares. Após a infecção primária por CMV, é desenvolvida a resposta imune, a qual impede a replicação viral e reativação do vírus, o qual permanece em fase de latência.⁽³³⁾ Entretanto, imunossupressão prolongada, como após TCTH, pode propiciar a reativação viral e levar a importantes complicações em diversos órgãos, como intestino, pulmão, olhos entre outros. O *status* sorológico pré-transplante do paciente e seu doador é o fator de risco mais importante a ser avaliado para reativação de CMV.⁽³⁴⁻³⁶⁾ Pacientes sem profilaxia adequada, em transplantes em que o paciente apresenta sorologia positiva para CMV, a reativação de CMV é alta, podendo chegar até 80%.⁽³⁶⁻³⁸⁾ Estudos anteriores que compararam o transplante haploidêntico repleto em células T e o transplante não aparentado com relação a reativação de CMV não encontraram diferença entre os grupos, sendo o CMV o principal vírus encontrado em

ambos os tipos de transplante.^(39,40)

Recentemente, o CIBMTR publicou uma análise comparando a incidência e impacto da infecção por CMV em 757 pacientes que receberam transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante e 2.008 pacientes submetidos a transplante aparentado, sendo 1.605 baseado em profilaxia clássica com inibidor de calcineurina e MTX ou MMF e 403 com ciclofosfamida pós-transplante. Nesse estudo, a ciclofosfamida pós-transplante, independentemente do tipo de doador, teve associação com maior incidência de infecção por CMV. Além disso, entre os pacientes que apresentaram infecção por CMV, o transplante haploidêntico correlacionou com pior sobrevida global e mortalidade não relacionada a recaída.⁽⁴¹⁾

Por muitos anos, a principal estratégia utilizada com relação ao CMV foi a preemptiva, na qual é feita a monitorização de PCR CMV quantitativo e o tratamento antiviral específico, usualmente com ganciclovir, valganciclovir ou foscavir, é iniciado na presença de carga viral, com objetivo de evitar possíveis quadros de doença causada pelo vírus, que, no contexto de estratégia preemptiva e transplante haploidêntico fica em torno de 11 a 17%⁽⁴¹⁻⁴³⁾ em diferentes estudos, inclusive em estudo brasileiro recente com dados do nosso serviço, a incidência de doença por CMV entre os receptores de transplante haploidêntico foi de 11,9%.⁽³⁶⁾

Nesse estudo, a presença de carga viral mais elevada correlacionou com maior incidência de doença por CMV e carga viral acima de 2.500UI/mL teve impacto na sobrevida global em análise multivariada.⁽³⁶⁾ Essa correlação entre carga viral e desfechos no transplante também já foi abordada por outros autores, como Green et al. que descreveram que a carga viral de CMV acima de 250UI/mL teve impacto em sobrevida global e mortalidade não relacionada ao transplante no 1º ano pós-transplante.⁽⁴⁴⁾ Outro estudo descreveu que viremia acima de 150UI/mL estava associada com menor probabilidade de *clearance* espontâneo.⁽⁴⁵⁾

A replicação do CMV envolve a clivagem de DNA viral e embalagem de cada genoma em capsídeos de vírus pré-formados, mediado pelo complexo CMV-terminase.⁽⁴⁶⁾ Recentemente, estratégias de prevenção de reativação de CMV vem sendo cada vez mais utilizadas, como o letermovir, antiviral envolvido na inibição da replicação viral ao se ligar a componentes do complexo terminase (UL51, UL56 ou ambos).^(47,48) Em estudo fase 3, duplo-cego, com 565 pacientes adultos com sorologia positiva para CMV, randomizados entre letermovir profilático ou estratégia preemptiva, o uso de letermovir levou a menores taxas de infecção significativa por CMV após 24

semanas do transplante (37,5% com CMV e 60% sem CMV).⁽⁴⁹⁾ Em análise *pos hoc* desse estudo, a mortalidade por todas as causas foi maior no grupo placebo do que no grupo que recebeu letermovir (31 *versus* 18,2% $p=0,02$),⁽⁵⁰⁾ sugerindo benefício em sobrevida em se evitar a infecção por CMV.

1.5 Reconstituição imune pós-transplante alogênico

A reconstituição imune pós-transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas está diretamente relacionada a significativa morbimortalidade pós-transplante, incluindo infecções virais, bacterianas, fúngicas e recaída da doença de base. Em particular, a imunidade T-específica é afetada por uma combinação de fatores, incluindo o regime de condicionamento utilizado, involução tímica, idade do paciente, tipo de enxerto, tipo de depleção de células T (*in vivo* ou *in vitro*), incompatibilidades de HLA entre doador e paciente, imunossupressão utilizada e DECH.⁽⁵¹⁾

Em geral, a imunidade inata apresenta recuperação nos primeiros meses pós-transplante, inicialmente com recuperação de monócitos, seguido de neutrófilos. Pouco se sabe sobre a recuperação de monócitos pós-transplante e, apesar de sua contagem geralmente normalizar no 1º mês pós-transplante, ainda não se sabe se a função monocitária é rapidamente restaurada ou se permanece comprometida.⁽⁵²⁾

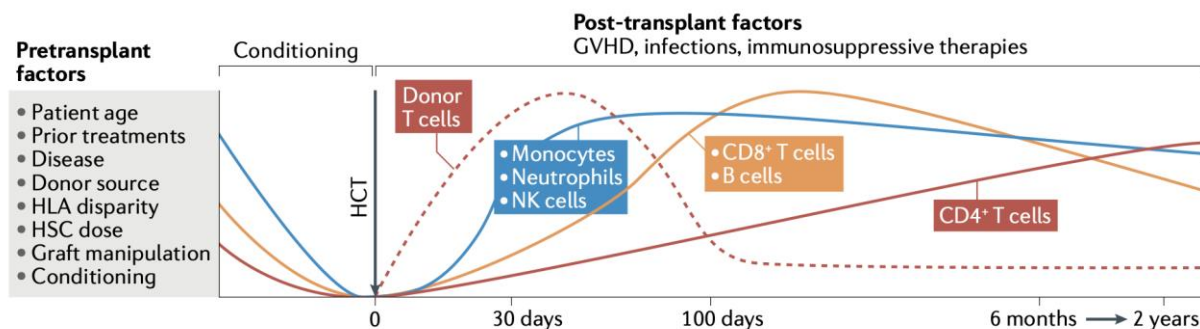
As células *natural killers* (NK) são membros da imunidade inata de fundamental importância na erradicação de patógenos durante fases iniciais de uma infecção, antes da resposta dos linfócitos T e B e também desempenham papel fundamental na resposta anti-tumoral.⁽⁵³⁾ As células NK funcionam por meio de receptores de superfície que incluem receptores inibitórios e ativadores – *Killer Ig-like receptors* (KIRs). Essas células são as primeiras células linfoides a se reconstituir pós-transplante e permanecem como os linfócitos predominantes na circulação nos primeiros 3 meses pós-transplante.⁽⁵²⁾

Um estudo retrospectivo que avaliou o impacto clínico da reconstituição precoce de células NK em 298 pacientes adultos submetidos a TCTH repletos em células T, com doador aparentado ou não aparentado com compatibilidade 10/10 ou 9/10 para LMA, LLA e SMD entre os anos 2005 a 2013 encontrou, em análise multivariada, que NK no dia 30 pós-transplante >150 células/ μ L foi fator independente

para maior sobrevida global, menor mortalidade relacionada ao transplante e menor número de infecções com risco a vida por bactérias ou CMV.⁽⁵⁴⁾

A recuperação de imunidade adaptativa que consiste especialmente em linfócitos T e linfócitos B é mais lenta, podendo levar até mais de 1 ano.⁽⁵⁵⁾ A reconstituição de linfócitos T acontece por 2 mecanismos principais: 1) sobrevivência e expansão periférica de linfócitos T de memória infundidos do doador ou 2) geração de linfócitos T do doador via timo por precursores hematopoiéticos do doador.⁽⁵⁵⁾ O timo é sítio primário para desenvolvimento de células T, sendo que precursores linfoides fazem o trajeto da medula óssea até o timo e participam de um processo complexo de proliferação, diferenciação, seleção positiva e negativa, resultando em linfócitos T CD4 e CD8 funcionais.

Nos primeiros meses após o transplante alogênico, a expansão periférica de linfócitos T do doador é o mecanismo predominante, com exceção de receptores de enxertos com depleção de linfócitos T *in vitro*, resultando em expansão clonal de linfócitos T CD8, com repertório limitado.⁽⁵⁶⁾ Nessa via timo-independente da reconstituição de linfócitos T, a expansão de linfócitos T do doador ocorre em resposta ao ambiente linfopênico pós-transplante, com abundantes interleucinas (IL)-7, IL-15, IL-2 e baixo número de linfócitos T regulatórios em comparação a células dendríticas no enxerto. A maior parte dos linfócitos que expandem nesse momento são CD8⁺, provavelmente em razão do ambiente linfopênico e, apesar de terem capacidade de identificar múltiplos antígenos, a maior parte apresenta repertório pequeno e são células de memória que respondem a patógenos. Além disso, esses CD8⁺ oligoclonais expandidos não estão sujeitos à tolerância central e apresentam potencial de causar DECH aguda (Figura 1).⁽⁵²⁾



Reconstituição imune pós-transplante alogênico.

Fonte: Adaptado de Velardi E, Tsai JJ, van den Brink MRM. T cell regeneration after immunological injury. Nat Rev Immunol. 2021;21(5):277-91. Fig. 1. Overview of the dynamics and determinants of T cell reconstitution after haematopoietic cell transplantation; p.278.⁽⁵⁷⁾

Figura 1. Demonstração da reconstituição imune pós-transplante

A recuperação de linfócitos T *de novo* acontece gradualmente após alguns meses, é dependente de um timo funcional e proporciona um repertório diverso de linfócitos T. Porém, esse mecanismo está prejudicado em pacientes mais idosos, devido a involução tímica e, assim como observado em paciente com diagnóstico de síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), o risco de infecção está associado às contagens de CD4.⁽⁵⁸⁾ Nessa via timo-dependente de reconstituição imune, as células CD34 infundidas se diferenciam em progenitores linfóides que migram até o timo. Esses progenitores, inicialmente duplo negativos (sem expressão de CD4 e CD8), passam por processo de maturação, tornando-se duplo positivos e, finalmente, se diferenciam em linfócitos CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁺CD8⁺ e saem do timo como linfócitos T *naïve* CD4⁺ ou CD8⁺. As células T *naïve* são um conjunto heterogêneo de células T que ainda não encontraram seu antígeno cognato.

Durante essas etapas de maturação, ocorre diversificação de repertório de receptores de células T (TCR), baseado em cadeia TCR β e TCR- α . Além disso, células T que identificam o próprio organismo sofrerão apoptose, em um processo de seleção negativa, enquanto células que se ligam com alta afinidade a não-auto antígenos sofrerão seleção positiva. Esse processo é essencial para proteção contra DECH e autoimunidade pós-transplante. O desenvolvimento de células T policlonais é obrigatório para permitir o controle de infecções e vigilância de tumores.⁽⁵⁹⁾

Em um transplante alogênico com enxerto não manipulado, linfócitos T CD8 compreendem a maior parte das células nos primeiros 6 meses. Linfócitos CD4⁺ apresentam recuperação mais prolongada, resultando na inversão CD4/CD8 pós-transplante, que pode persistir por anos. Linfócitos CD4⁺ *naïve* (CD4⁺ CD45RA⁺)

costumam aparecer cerca de 6 meses pós-transplante. A geração e manutenção de repertório de TCR são fatores críticos na reconstituição imune, sendo restaurados cerca de 6-12 meses pós-transplante.⁽⁵²⁾

A recuperação de linfócitos B acontece cerca de 6 a 9 meses pós-transplante, é dependente dos linfócitos T, inicialmente está prejudicada devido ao repertório limitado de anticorpos e pode ser prejudicada pela imunossupressão e DECH.⁽⁶⁰⁾ Enquanto plasmócitos do paciente podem sobreviver ao regime de condicionamento,⁽⁶¹⁾ os linfócitos B, geralmente não sobrevivem. A reconstituição do compartimento de células B ocorre primariamente através de regeneração *de novo* através de progenitores da medula óssea, sendo a expansão de células B maduras derivadas do doador menos significativa.⁽⁶²⁾

Células B *naïve* (CD19⁺ IgM low IgD⁺) adquirem fenótipo B transicional (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) e essas células são as primeiras a sair da medula óssea,⁽⁶³⁾ então adquirem CD27 de superfície, caracterizando um linfócito B de memória. O compartimento de células B contém 2 subpopulações de linfócitos B de memória: 1) células B com comutação de classe (*class-switched*), que são produzidos em centros germinativos de tecidos linfoides sob influência de células CD4 e migram para diversas regiões do corpo, incluindo medula óssea, onde se diferenciam em plasmócitos produzindo anticorpos de alta afinidade, e 2) células B de memória IgM, equivalentes a células B da zona marginal do baço, que se ligam a polissacarídeos da parede celular microbiana na circulação e as transportam para centro germinativo do baço iniciando uma resposta IgM contra micróbios encapsulados.⁽⁶⁴⁾

No contexto pós-transplante, células B costumam permanecer em níveis baixos ou indetectáveis durante os primeiros 100 dias pós-transplante. A reconstituição de células B de memória (CD19⁺ CD27⁺) é entravada pela lenta reconstituição de linfócitos T *helper* CD4⁺ e, além disso, receptores de transplante alogênico experimentam prejuízos na troca de isotipos de anticorpos e na hipermutação somática pós-transplante, o que contribui ainda mais para repertório limitado de anticorpos pós-transplante.⁽⁶⁵⁾ A dosagem de imunoglobulinas costuma ser baixa pós-transplante, seguida de aumento gradual, com sequência que lembra de neonatos, com aumento inicial de IgM (2-6 meses), seguido de IgG (3-18 meses) e IgA (6-36 meses).⁽⁵²⁾

1.6 Reconstituição imune no contexto de soroterapia como imunossupressão

A mortalidade relacionada ao transplante foi reduzida nas últimas décadas como consequência de melhorias nos regimes de condicionamento, terapias de suporte e manejo de infecções. A DECH permanece como uma ameaça que pode influenciar a reconstituição imune pós-transplante e os desfechos desse procedimento. A administração de anticorpos contra células T e outras células (soroterapia) foi inicialmente estabelecida na década de 1980 em diferentes regimes de condicionamento com uso do ATG, com múltiplas formulações conforme a células de origem e método de produção, sendo o ATG proveniente do coelho (Genzyme) a mais utilizada.⁽⁶⁶⁾

O ATG suprime a aloreatividade de células T do hospedeiro, favorecendo a enxertia,⁽⁶⁷⁾ além disso, devido a sua meia-vida longa, seu efeito linfólítico persiste por pelo menos 1 mês pós-transplante, eliminando os linfócitos T do doador e reduzindo o risco de DECH, às custas de prejuízos na imunidade contra vírus e respostas de enxerto contra tumor.⁽⁶⁸⁾

Willemsen et al.⁽⁶⁹⁾ analisaram a influência da soroterapia na reconstituição imune de 148 crianças que receberam ATG (n=110) ou alemtuzumab (n=38) no regime de condicionamento. Alemtuzumab correlacionou com recuperação mais atrasada de linfócitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos NK comparado ao ATG, com mais infecções por EBV no grupo do ATG e mais infecções por adenovírus no Grupo Alemtuzumab, sem diferença com relação à reativação de CMV entre os grupos.

O *clearance* do ATG derivado de coelho é influenciado pelo peso do paciente, contagem absoluta de linfócitos e fonte do enxerto utilizado no transplante. Em um estudo retrospectivo que avaliou, em 251 crianças submetidas ao 1º transplante alogênico, medidas de exposição ao ATG, incluindo a área total sob a curva (AUC) e correlacionou com reconstituição imune, a chance de reconstituição imune bem sucedida foi inversamente proporcional ao aumento da AUC do ATG pós-transplante. Com cordão umbilical, redução da reconstituição imune foi evidenciada acima do quartil mais baixo (≥ 20 AU $\times$ dia/mL; $p=0,0024$), enquanto em enxertos com fonte periférica ou medula óssea, redução da reconstituição imune foi identificada apenas no quartil mais alto (≥ 100 AU $\times$ dia/mL; $p=0,0024$). Nesse estudo, reconstituição imune bem sucedida no dia 100 pós-transplante teve associação com aumento de sobrevida global *hazard ratio* [HR 0.49, IC 95% 0,29-0,81; ($p=0,0047$)] por menor mortalidade não relacionada à recaída.⁽⁷⁰⁾

1.7 Reconstituição imune no contexto de ciclofosfamida pós-transplante

Grande parte dos estudos que avaliaram a reconstituição imune após o uso de ciclofosfamida pós-transplante são provenientes do contexto de transplantes haploidênticos. Um estudo publicado por Tian et al.,⁽⁷¹⁾ em que foram analisados 214 receptores de transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante, com análise de citometria de fluxo para avaliar reconstituição imune nos dias 30, 60, 90, 180, 270 e 360 pós-transplante, encontrou que os linfócitos citotóxicos CD3⁺ CD8⁺ no dia 90 correlacionaram com infecção bacteriana, mortalidade não relacionada a recaída, sobrevida livre de leucemia e sobrevida global, com corte de 375 células/UL, sendo a recuperação rápida de linfócitos CD3⁺ CD8⁺ um preditor de melhores desfechos no transplante.⁽⁷¹⁾

Os mecanismos pelos quais a ciclofosfamida modula a resposta aloimune não estão completamente compreendidos. Um estudo que avaliou a reconstituição de células T no contexto de transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante, encontrou que linfócitos T regulatórios (Tregs) (CD4⁺ CD45RA⁻ Foxp3^{high}) apresentam recuperação rápida e expressavam altos níveis de aldeído desidrogenase (ALDH), mecanismo relacionado com resistência a ciclofosfamida. Além disso, nesse estudo, a remoção de Tregs reduziu a proteção da ciclofosfamida pós-transplante contra DECH.⁽⁷²⁾

Outro estudo publicado por Kanakry et al., avaliou a reconstituição de linfócitos por citometria de fluxo (n=74) e sequenciamento de receptor de antígenos (n=35) em receptores de transplante alogênico compatível aparentado ou não aparentado, com condicionamento mieloablativo e ciclofosfamida pós-transplante como único agente de imunossupressão. Nesse estudo, a reconstituição de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ foi primariamente de células efetoras de memória (CD45RA⁻CCR7⁻) e com diferenciação terminal (CD45RA⁺CCR7⁻), enquanto células T *naïve* e emigrantes tímicos recentes, definidos por expressão de CD31 em CD4⁺CD45RA⁺, tiveram recuperação lenta. Além disso, houve baixa diversidade de receptores β (TRB), enquanto células B eram predominantemente de fenótipo *naïve*. Em análise multivariada, receptores soropositivos para CMV tiveram associação positiva com reconstituição de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e diversidade TRB, enquanto a ocorrência de DECH aguda foi associada a menores números de linfócitos T. Além disso, em 1 ano pós-transplante, a reativação

de CMV foi associada, em análise multivariada, a maiores números de linfócitos T CD8⁺.⁽⁷³⁾

Outro estudo, desenvolvido com modelos murinos submetidos a transplante haploidêntico repleto em célula T, com ciclofosfamida pós-transplante, encontrou que a ciclofosfamida induziu comprometimento funcional de células T alorreativas, apoiado por mecanismos supressores estabelecidos dentro de 1 dia após a ciclofosfamida. Esses mecanismos supressivos incluíam a recuperação rápida e preferencial de células T *regs* CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, incluindo aquelas que eram específicas a aloantígenos, com uma função crítica ao longo do tempo.⁽⁷⁴⁾

Estudo recente, publicado por Rambaldi et al.⁽⁷⁵⁾ que avaliou a reconstituição imune de células T e NK em 60 pacientes submetidos a transplante haploidêntico com fonte medula óssea ou sangue periférico e 35 pacientes submetidos a transplante HLA-compatível com profilaxia clássica de DECH concluiu que, comparado ao transplante compatível com profilaxia clássica, a reconstituição precoce de linfócitos T foi atrasada no transplante haploidêntico e com predomínio de células T de memória, com redução importante de células T *naïves*. Foi encontrado maior número de Tregs do que T convencionais e aumento da expressão de PD-1 nas células T de memória. Pacientes submetidos a transplante haploidêntico que não desenvolveram DECH tinham maiores expressões de PD-1 nos linfócitos CD4 Treg em 1 mês pós-transplante. No transplante haploidêntico, células NK estavam reduzidas logo após o transplante, com expansão preferencial de células NK imaturas CD56^{bright}CD16 comparado ao transplante compatível. O aumento de células NK imaturas teve associação com reativação de CMV e aumento da incidência de DECH crônica.⁽⁷⁵⁾

Outro estudo recente, publicado por Russo et al.,⁽⁷⁶⁾ avaliou a dinâmica de reconstituição de células NK em 17 pacientes que foram submetidos a transplante alogênico haploidêntico não manipulado, com ciclofosfamida pós-transplante. O autor descreveu uma importante proliferação de células NK do doador imediatamente após a infusão, porém, após a ciclofosfamida, ocorreu uma marcada redução dessas células NK, sugerindo eliminação das células em divisão, visto que essas células não expressam aldeído desidrogenase e podem ser destruídas pela ciclofosfamida. Após dia +15, células NK imaturas (CD62L⁺ NKG2A⁺ KIR⁻) tornaram-se mais prevalentes, favorecidas por altos níveis de IL-15.

Como as taxas de reativação de CMV pós-transplante haploidêntico são altas, mesmo com níveis elevados de CD8⁺, isso deve estar relacionado a proteção

não efetiva conferida pelas células NK, fazendo com que alguns centros da Europa mudem a seleção positiva de CD34⁺,⁽⁷⁷⁾ para seleção negativa de células TCRαβ/CD19, reduzindo o risco de DECH, sem depletar células NK, linfócitos Tγδ e células progenitoras hematopoiéticas, facilitando enxertia e recuperação imunológica,⁽⁷⁸⁾ bem como a sobrevida global dos pacientes. Porém, os custos relacionados ao procedimento de seleção ainda tornam esse um protocolo impeditivo na maior parte dos lugares, fazendo com que o uso da ciclofosfamida pós-transplante ainda seja o protocolo de escolha.

Apesar de ser um procedimento de menor custo, o uso da ciclofosfamida pós-transplante também está relacionado ao desenvolvimento de síndrome de liberação de citocinas (SLC), que não costuma ocorrer com depleção TCRαβ/CD19, sendo que em um relato de 75 pacientes adultos submetidos ao transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante, SLC ocorreu em 87% dos casos, sendo que 12% desenvolveram formas graves, sendo essa complicação relacionada também a atraso de enxertia neutrofílica, com impacto negativo em sobrevida global.⁽⁷⁹⁾

Por fim, como a reconstituição imune após o uso da ciclofosfamida e sua associação com impactos clínicos continuam desconhecidos, estudo recente, utilizando inteligência artificial, em uma análise não planejada, avaliou assinaturas com significância clínica por meio de informações de imunofenotipagem, proteômicas e clínicas e alterações de transcriptoma de linfócito que prediziam desfechos clínicos em transplante. Nesse estudo, a cinética de reconstituição imune de linfócitos T CD3⁺, linfócitos B e NK após dia 28 foi similar entre 70 pacientes submetidos ao transplante haploidêntico e 75 com 100% de compatibilidade, todos com uso de ciclofosfamida pós-transplante, utilizando condicionamento mieloablativo e como fonte de células de medula óssea. Na análise específica de subtipos de linfócitos T, em 2 meses pós-transplante, não havia diferença entre transplantes haploidêntico e 100% compatíveis, porém, em 1 ano pós-transplante, linfócitos T CD4⁺ estavam significativamente mais baixos no transplante compatível do que no haploidêntico (218 *versus* 358 células/μL, p<0,05). A combinação de aumento de CD4⁺ e CXCL9 no dia 28 foi preditivo para DECH aguda. Além disso, aumento de células NK levou a aumento de sobrevida global devido a redução de mortalidade não relacionada, e relacionada à recaída. Pacientes que apresentaram recaída precoce apresentavam perda de assinatura inflamatória nas células NK e exaustão transcricional de células T CD8⁺.⁽⁸⁰⁾

1.8 Reconstituição imune citomegalovírus-específica

A reconstituição de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ é crucial para proteção contra o CMV e para atingir controle sustentado da infecção. Em estudo que avaliou 13 pacientes submetidos a transplante aparentado e 11 a transplante não aparentado, com profilaxia clássica de imunossupressão, nos casos de transplante aparentado, em que ambos paciente e doador apresentavam sorologia positiva para CMV, a recuperação de linfócitos T citotóxicos foi rápida, atingindo até 21% de todos os linfócitos T CD8⁺, o que não aconteceu se o paciente ou doador apresentassem sorologia negativa para CMV antes do transplante. Já no transplante não aparentado, a recuperação de linfócitos T CMV-específicos foi atrasada com relação ao aparentado, com ausência de linfócitos CMV-específicos até 100 dias pós-transplante. Nesse estudo, recuperação de linfócitos CMV-específicos acima de 10x10⁶/L teve associação com proteção contra doença por CMV.⁽⁸¹⁾ A reconstituição atrasada de linfócitos T CMV-específicos no contexto de transplante não aparentado provavelmente tem relação com a maior imunossupressão nesse tipo de transplante e também pelo uso de ganciclovir profilático nessa situação, que impede a expansão de linfócitos T CMV-específico dependente da exposição ao antígeno.⁽⁸²⁾

Os linfócitos T CD8⁺ reconhecem proteínas estruturais do CMV (proteína pp65 e pp150) ou proteínas não-estruturais expressas em células infectadas (proteína IE72).^(83,84) Em paciente previamente infectado por CMV, a frequência de células T CD8⁺ específicas para peptídeo pp65 pode ser alta (1-5% de todas as células T CD8⁺), permanecendo por anos.⁽⁸⁴⁾ Linfócitos T CD4⁺ também são importantes para controle imune do CMV, visto que linfócitos T CD4⁺ oferecem citocinas necessárias para ativação e diferenciação de linfócitos T CD8⁺ de memória em células efectoras.

Estudo que avaliou a reconstituição de linfócitos CMV-específicos em 50 receptores de transplante HLA compatível ou com *mismatch*, demonstrou que linfócitos T de memória central CD45RO⁺ e CD62L⁺ apresentavam expansão logo após reativação⁽⁸⁵⁾ e estudo que avaliou reconstituição imune CMV específica em 15 pacientes submetidos a transplante haploidêmico, através de citometria de fluxo, utilizando peptídeos de CMV, demonstrou que no grupo com resolução de antigenemia, o número máximo de linfócitos CMV-específicos foi menor, entretanto o pico foi atingido de forma mais rápida (mediana de 21 *versus* 78 dias).⁽⁸⁶⁾

Outro estudo avaliou a reconstituição CMV-específica em 175 pacientes submetidos a transplante haploidêntico com seleção de células CD34 ou *sirolimus* como profilaxia de DECH, por meio da técnica de *IFN-gamma Enzyme-Linked ImmunoSpot* (ELISpot). Em 30 dias, 21,7% dos pacientes tinham linfócitos T CMV-específicos acima de 1sfc/mL, valor de corte com discriminação, com alta especificidade, para não reativação de CMV em curva ROC. Em 90 dias, 29% dos pacientes atingiram esse corte. Em 180 dias, 52,9% dos pacientes atingiram esse corte.⁽⁸⁷⁾

Huntley et al.⁽⁸⁸⁾ publicaram um estudo multicêntrico, observacional, prospectivo, no qual foram recrutados 97 pacientes submetidos a transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante (n=71), ou HLA-compatível (aparentado, n=15 e não aparentado, n=11). Dos 97 pacientes, 62 desenvolveram um ou mais episódios de reativação de CMV, com frequência semelhante entre os tipos de transplante. Com relação a reconstituição imune, os pacientes foram avaliados com mediana de 1-4 amostras/paciente até D+180 após transplante. Os linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ não foram diferentes entre os grupos nos dias +30, +60 e +180, porém maior número de CD4⁺ no D+90 foi observado no Grupo Haploidêntico. Reativação de CMV não afetou a reconstituição de linfócitos CMV-específicos CD4⁺ ou CD8⁺ até D+180, com aumento de resposta ao longo do tempo, atingindo 85% dos pacientes em ambos os grupos ao final do acompanhamento. O número de pacientes com resposta mensurável não foi diferente entre os grupos, mas mais pacientes do grupo com transplante HLA-compatível apresentaram linfócitos T CMV-específicos CD4⁺ no D+30 (p=0,03). Subanálises do estudo também sugeriram que reconstituição de linfócitos T CD8⁺ CMV-específicos ocorreu mais rapidamente no transplante haploidêntico do que no não aparentado.⁽⁸⁸⁾ O mesmo grupo avaliou 66 pacientes submetidos a transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante e encontrou que a infecção por CMV se relaciona com altos níveis de células T CD27⁻ CD28⁻ que se comportam como Tregs, com correlação sub ótima entre linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ e Tregs, mostrando que linfócitos Tregs e linfócitos T CMV-específicos apresentam cinética distinta.⁽⁸⁹⁾

Estudo recente avaliou 21 pacientes submetidos a transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante, com 19/21 pacientes apresentando reativação de CMV. Pacientes com maior viremia de CMV apresentaram aquisição acelerada de linfócitos T efetores terminais, enquanto aqueles com viremia subclínica apresentaram recuperação pouco melhor de CD8⁺ *naive*, enquanto os 2 pacientes sem viremia apresentam recuperação forte de subtipos de linfócitos *naive*, sugerindo que

reativação de CMV leva a senescência prematura de células T e atraso na recuperação de linfócitos T *naive* no transplante haploidêntico. Nas semanas 3-4 pós-transplante, linfócitos CMV específicos eram indetectáveis na maioria dos pacientes. No 2º mês, quando maior parte dos pacientes apresentou reativação de CMV, ambos CD4⁺ e CD8⁺ CMV específicos expandiram, com fenótipo proliferativo. A partir do 3º mês, esse fenótipo foi trocado por fenótipo efetor, com expressão de T-bet em associação a CD57 e/ou CD45RA, indicando diferenciação terminal. Um ano após transplante, células T CMV-específicas foram semelhantes às do doador.⁽⁹⁰⁾

Células NK também apresentam papel importante na defesa de infecções como o CMV. Jin et al. avaliaram a dinâmica das células NK em 29 pacientes submetidos a transplante haploidêntico, com ATG, sem ciclofosfamida pós-transplante, e demonstraram que células NK produtoras de IFN- γ expandiram após reativação de CMV, sendo células NK com CD56^{dim} com expressão de altos níveis de NKG2C e KIR, mas baixos níveis de NKG2A, suportando a ideia de que reativação de CMV induz expansão de células NK mais maduras, com características de memória, contribuindo com controle da viremia a longo prazo.⁽⁹¹⁾

Outro estudo avaliou reconstituição de células NK em 50 pacientes com leucemia aguda submetidos a transplante haploidêntico, com ATG, ciclosporina e MTX, fora da plataforma de ciclofosfamida pós-transplante. Análise multivariada demonstrou que reativação de CMV e dose de células T infundidas $>3,2 \times 10^8$ foram fatores independentes para redução de recaída. Células NK CD56^{bright} CD16^{dim} DNAM1⁺ aumentaram nos dias 30 a 90 pós-reativação de CMV e caíram em pacientes sem CMV, o que pode estar relacionado com redução de recaída nessa situação.⁽⁹²⁾

Muccio et al. avaliaram células NK de memória em crianças submetidas a transplante haploidêntico com depleção células T alfa e beta e CD19⁺ com infecção por CMV. Nesses pacientes, células NK de memória expressando NKG2C e CD57 expandiram na maioria dos pacientes de 3 a 12 meses pós-transplante.⁽⁹³⁾

Outro estudo, com 48 pacientes submetidos a transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante, com análise de citometria de fluxo, demonstrou que CMV acelerou a reconstituição de células NK, com expansão de CD158b1b2^{pos}/NKG2A^{neg}/NKG2C^{pos}/NKp30^{lo}, com aumento em pacientes com múltiplas reativações. O CMV desregula expressão gênica de NKG2C, NKG2A e NKp30, mediando assim a expansão das células NK com características adaptativas. Esses resultados implicam que a disfunção ou exaustão das células NK em pacientes com CMV

é induzida, pelo menos parcialmente, pela expressão induzida por CMV de inibidores de *checkpoint*.⁽⁹⁴⁾

A monitorização de imunidade CMV-específica pós-transplante pode ser útil para determinar o risco de desenvolvimento de infecção por CMV e suas complicações. O método ELISpot identifica a liberação de IFN- γ produzido por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ em resposta a antígenos do CMV como *immediate-early 1* (IE-1) e fosfoproteína 65 (pp65), sendo medido por meio de contagem de *spots* por 250.000 células mononucleares de sangue periférico. Em estudo que monitorizou 63 transplantes alogênicos, corte de 50 *spots*/250.000 células para IE-1 e 100 *spots*/250.000 para pp65 identificou pacientes com menor risco de CMV, na ausência de DECH e uso de corticoide.⁽⁹⁵⁾ Outro estudo prospectivo determinou que alta imunidade CMV-específica realizada através de ELISpot apresentavam menor risco de desenvolver infecção por CMV, podendo ser útil na diferenciação de pacientes que necessitam de profilaxia medicamentosa por exemplo.⁽⁹⁶⁾

A técnica de ELISpot também pode ser útil para prever risco associado com baixa carga viral em reativação de CMV. Um estudo avaliou 55 receptores de transplante com baixa carga viral de CMV e o baixo número de *spots* aumentou em 8 vezes o risco de progressão da carga de CMV, sendo que o risco aumentou 2% com redução de 20 *spots* em pp65.⁽⁹⁷⁾

Assim, na maioria dos estudos, a reconstituição de células T e NK está prejudicada, com risco aumentado de infecção por CMV, após transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante, mas a busca de fatores que influenciem essa reconstituição imune específica para CMV e intervenções para melhorá-la é de crucial importância nesse momento. Além disso, apesar de poucos estudos terem avaliado a reconstituição imune CMV-específica no contexto de transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante, ainda faltam estudos avaliando essa plataforma de imunossupressão no contexto de transplante não aparentado 100% compatível, uso esse que vem aumentando muito nos últimos anos devido aos benefícios clínicos apontados. Assim, avaliação desses perfis imunológicos podem nos permitir agir preventivamente após o transplante para modificar riscos ao invés de esperar pelas complicações clínicas.

1.9 Objetivos

1. Avaliar a cinética da reconstituição imune global e de linfócitos citomegalovírus-específicos pós-transplante alogênico de medula óssea utilizando doadores não aparentados com dois tipos de imunossupressão (uso de timoglobulina no condicionamento ou ciclofosfamida pós-transplante);
2. Descrever os desfechos clínicos (sobrevida global, mortalidade relacionada ao transplante, mortalidade relacionada a recaída, doença do enxerto contra o hospedeiro, reativação viral) da população apresentada;
3. Correlacionar reconstituição imune e de linfócitos citomegalovírus-específicos com complicações do transplante de medula óssea e morte relacionada ao transplante;
4. Correlacionar reconstituição imune com doença do enxerto contra o hospedeiro;
5. Correlacionar reativação de citomegalovírus com reconstituição de linfócitos citomegalovírus-específicos.

2 MÉTODOS

2.1 Declaração de ética

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local do Hospital Israelita Albert Einstein (São Paulo, Brasil) sob número CAAE: 00527018.6.0000.0071 e SGPP 3562-18.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes da pesquisa, bem como consentimento para armazenamento de amostra de sangue periférico.

2.2 Desenho do estudo

Estudo de coorte prospectiva.

2.3 Pacientes e local de coleta dos dados

Pacientes submetidos a transplante de medula óssea alogênico com doador não aparentado utilizando imunossupressão pós-transplante com ATG ou ciclofosfamida pós-transplante nos anos de 2019 a 2021 no Hospital Israelita Albert Einstein. A escolha por uma ou outra abordagem foi baseada na alocação em um estudo simultâneo na mesma instituição, um ensaio clínico no qual os pacientes foram randomizados entre ATG e PTCy (NCT03818334) ou na escolha clínica da equipe de transplante de medula óssea.

2.4 Critérios de inclusão e exclusão

2.4.1 Critérios de inclusão

1) Pacientes submetidos a TCTH alogênico com doador não aparentado utilizando imunossupressão pós-transplante com ATG ou ciclofosfamida pós-transplante no Hospital Israelita Albert Einstein.

2.4.2 Critérios de exclusão

- 2) Recusa do paciente em participar do estudo;
- 3) Paciente e doador com sorologia negativa para CMV pré-transplante;
- 4) Paciente já submetido a um transplante alogênico prévio.

2.5 Protocolo de estudo

Foi apresentado um TCLE, explicando objetivo da pesquisa e necessidade de coleta de amostras de sangue para pesquisa em momentos pré-determinados do transplante, ao paciente candidato ao transplante de medula óssea.

Foram coletados dados demográficos e clínicos na ocasião do transplante, como idade, sexo, diagnóstico, *status* da doença previamente ao transplante e *performance status* dos pacientes, mensurado por meio do *score* de Karnofsky, dados técnicos e referentes ao tipo de transplante, HLA do paciente e doador, tipo de condicionamento utilizado, regime de imunossupressão empregado, fonte de células, celularidade do enxerto (número de células nucleadas totais, CD34⁺ e CD3⁺ infundidas), sexo e idade do doador, sorologia para CMV do paciente e doador. Também foram acessados dados referentes a enxertia neutrofílica e plaquetária, quimerismo, hemograma completo com diferencial, avaliação de infecções virais, incluindo CMV, adenovírus, EBV, poliomavírus (BKV), emprego de tratamento para reativação de CMV, medicações e drogas empregadas, DECH, complicações e seguimento do paciente pós-

transplante. Desfechos de sobrevida: data do último seguimento, data do óbito (se aplicável), causa de morte.

2.6 Protocolo de tratamento utilizado e definições

Durante avaliação pré-transplante, todos os pacientes foram submetidos a avaliação sorológica para HIV, hepatite A, B e C, sífilis, doença de Chagas, toxoplasmose, HTLV e herpesvirus, incluindo CMV, EBV, herpes simples e varicela-zoster.

As vigilâncias virais pós-transplante foram realizadas da seguinte forma: PCR quantitativo para CMV 2 vezes por semana, PCR quantitativo para adenovírus semanalmente e PCR quantitativo para EBV a cada 2 semanas, enquanto paciente estivesse em vigência de imunossupressão. Pesquisa de PCR quantitativo para BKV em urina e herpes vírus tipo 6 (HHV-6) foram realizadas apenas na suspeita clínica. O limite inferior de detecção para CMV, adenovírus, EBV, BKV e HHV-6 foram: abaixo de 103UI/mL (2,01log/mL), 700 cópias/mL (2,84 cópias de log/mL), 210 cópias/mL (2,32 log cópias/mL), 500 cópias/mL e 300 cópias/mL (2,48 log cópias/mL), respectivamente.

Todos os pacientes receberam profilaxia antimicrobiana com trimetoprima-sulfametoxazol 800/160mg diariamente até o dia -2. Este tratamento foi retomado após reconstituição hematológica ou foi substituído por pentamidina intravenosa. Como profilaxia bacteriana, foi utilizado levofloxacino 500mg/dia até a recuperação neutrofílica e como profilaxia viral, foi utilizado aciclovir 500mg/m² duas a três vezes ao dia (por via intravenosa) ou 400mg por via oral 12/12h até a reconstituição imune, por pelo menos 6 meses após o transplante. Profilaxia antifúngica foi realizada com fluconazol 400mg/dia ou micafungina 100mg/dia. Em casos de alto risco para fungos filamentosos, como LMA alto risco ou doença refratária, neutropenia prolongada, idosos, infecção por fungos filamentosos prévios, foi utilizado voriconazol 200mg 12/12h pelo menos até D+75 pós-transplante. Infecção por CMV foi definida como qualquer detecção de DNA de CMV em amostras de plasma. Infecção recorrente por CMV foi definida como nova infecção por CMV em um paciente com evidência prévia de infecção por CMV sem o vírus detectado por 4 semanas durante a vigilância ativa. Doença por CMV foi definida como a presença de sintomas e/ou sinais clínicos relacionados ao órgão envolvido e CMV documentado no tecido.⁽⁹⁸⁾ No caso de infecção por CMV, o ganciclovir

foi a primeira linha de terapia. Em casos de citopenias ou toxicidade com ganciclovir, foi utilizado foscarnet. Em casos de infecção por EBV, o tratamento com rituximabe foi iniciado se a viremia acima de 10.000 cópias/mL. Cistite hemorrágica causada por BKV foi definida de acordo com a Conferência Europeia de Infecções em Leucemia (ECIL): sinais ou sintomas clínicos de cistite, hematúria grau 2 ou superior, e cargas virais de virúria BKV $>7 \log 10$ cópias/mL.⁽⁹⁹⁾ O cidofovir foi o tratamento de escolha nos casos de doença refratária e grave.

Enxertia neutrofílica foi definida como o primeiro de três dias consecutivos com contagem de neutrófilos $>0,5 \times 10^9/L$ e enxertia plaquetária foi definida como 7 dias consecutivos com contagem plaquetária acima de 20.000/ μL , na ausência de transfusão de plaquetas.

Com relação a intensidade dos regimes de condicionamento utilizados, condicionamento mieloablativo consistiu em bussulfano com AUC de 4000 a 5000 por 4 dias (Dias -6 a -3) e fludarabina 40mg/m² (Dias -6 a -3) ou ciclofosfamida 60mg/kg (Dias -5 e -4) e irradiação corporal total (TBI) 1200cGy (dividido em Dias -3 a -1) ou TBI 990 a 1200cGy dividido nos dias D-8, -7 e -6. Fludarabina 30mg/m² D-5; -4, -3 e -2. Regime de condicionamento de intensidade reduzida consistiu em bussulfano 1AUC 5000 por 2 dias (Dias -4 a -3) e fludarabina 40mg/m² (Dias -6 a -3) ou irradiação medular total (TMI) 6Gy (D-8 e D-7), fludarabina 30mg/m² (D-6 a D-2) em bussulfano AUC 4800 (D-5 e D-4).^(100,101)

A profilaxia da DECH consistiu em ciclofosfamida 50mg/kg/dia nos Dias +3 e +4; *tacrolimus* no D+5 (concentração de 5-15ng/mL) e MMF 15mg/kg/dia por via oral dos dias +5 a +35. Nos casos que receberam ATG, a profilaxia consistiu em ATG coelho 3-7,5mg/kg (Sanofi Genzyme), MTX 5mg/m² nos dias +1, +3, +6 e +11 e início do inibidor de calcineurina no Dia -2. Em ambos os grupos, o inibidor de calcineurina foi mantido até o dia +120, quando foi iniciado o desmame, até o dia +180, exceto na ocorrência de DECH. DECH aguda graus II-IV foi tratada com prednisona 2mg/Kg (ou equivalente de metilprednisolona) como 1ª linha e, em caso de progressão após 3 dias de tratamento ou ausência de melhora em 5-7 dias, a 2ª linha de tratamento escolhida foi ruxolitinibe 10mg 2x/dia.

A análise de recuperação imune global e CMV-específica foi realizada por citometria de fluxo pré-início do condicionamento do transplante e nos dias +30, +60, +100, +180. Foi realizada citometria de fluxo com análise de população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, células NK e população linfóide B, conforme descrito abaixo. Além disso,

foi realizada análise de recuperação imune CMV-específica por meio da realização de técnica de ELISpot.

Foram realizados correlação dessa reconstituição imune com desfechos do transplante.

2.7 Obtenção de amostra

Foram obtidas amostras de sangue periférico (10mL) dos pacientes nos dias pré-início do condicionamento e próximo dos dias +30, +60, +100, +180 pós-transplantes através de punção de veia periférica ou via cateter.

2.8 Processamento e congelamento de amostra

Todos os sangues periféricos coletados foram processados utilizando gradiente de densidade Ficoll-Paque, conforme descrito abaixo:

1. Em um tubo de 15mL, foi adicionado sangue fresco (cerca de 8mL) e igual quantidade de solução PBS;
2. Em outro tubo, foi adicionado 5mL de solução Ficoll-Paque através de seringa;
3. Cuidadosamente, a solução contendo sangue e PBS foi colocada acima da solução de Ficoll (Figura 2).

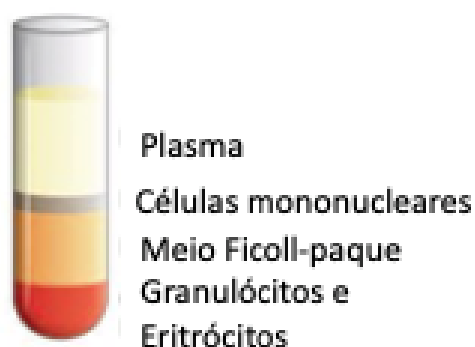


Amostra de sangue e PBS acima da solução de Ficoll-Paque.

Figura 2. Solução de sangue e PBS e Ficoll

4. A solução foi levada a centrífuga com velocidade 500* por 30 minutos, em temperatura de 18 a 20°C, sem breque (*no brake*);

5. Após centrifugação, a camada superior passa a conter plasma e plaquetas (Figura 3), a qual foi retirada e desprezada.



Camadas após centrifugação.

Figura 3. Camadas após centrifugação

6. A camada de células linfomononucleares foi delicadamente retirada e colocada em tubo estéril com pipeta estéril;

7. Foi adicionado PBS a solução de linfomononucleares (aproximadamente 5mL) e ressuspendida;

8. Retirado 10 μ L dessa solução para diluição 1:1 em azul de *trypan* para contagem de células em Câmara de Neubauer e determinação de viabilidade;

9. Novamente, a solução foi centrifugada a 500g por 5 minutos a 18 a 20°C;

10. O sobrenadante foi retirado;

11. O *pellet* contendo células linfomononucleares foi ressuspendido e as células linfomononucleares foram criopreservadas em meio de congelamento RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), L-glutamina (Gibco) (cerca de 1×10^6 células/mL) e 10% DMSO. Após adição da solução crioprotetora as células foram transferidas para tubo de congelamento, e transferidas para *freezer* mecânico a -80°C, sendo descongelados apenas no momento da realização de citometria de fluxo ou ELISpot.

2.9 Enzyme-linked immune absorbent spot

O ensaio de ELISpot é um tipo de ensaio que foca na medida quantitativa da frequência de secreção de citocina por uma única célula. O ensaio de ELISpot é também uma forma de marcação imunológica, uma vez que é classificada como uma técnica que usa anticorpos para identificar/medir uma substância biológica ou química. Neste caso o ELISpot foi utilizado como método para medir o número de células capazes de reconhecer antígeno (utilizando a fosfoproteína 65 [pp65] do capsídeo do CMV) e responder ao estímulo antigênico produzindo e secretando IFN- γ .

2.10 Descrição do ensaio

Para quantificação da frequência de células produtoras de IFN- γ , foi utilizado o protocolo de acordo com as instruções do fabricante do kit ELISpot IFN- γ – R&D Systems (Cat. EL285), em que anticorpo monoclonal específico para IFN- γ humano é pré-revestido em uma microplaca com suporte de difluoreto de polivinilideno (PVDF).

Foi adicionado aos poços da placa de ELISpot, 200 μ L de meio de cultura AIM-V estéril e incubado à temperatura ambiente por, pelo menos, 20 minutos. Após esse período, o meio de cultura foi retirado da placa por aspiração e adicionado no mínimo 1×10^5 de células linfomononucleares por poço, e como controle negativo 1×10^5 sem nenhum estímulo por poço. Foram adicionados também os controles positivos (IFN- γ Humano).

As células foram estimuladas com PepTivator[®] CMV pp65 - Miltenyi Biotec (1 μ g/mL) para avaliação da resposta anti-CMV. Para o controle positivo de estímulo, foi utilizado 50ng/mL de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) Sigma-Aldrich St. Louis, USA (P8139) com 500ng/mL de Ionomicina Sigma-Aldrich St. Louis, USA (I0634) totalizando um volume final de 100 μ L.

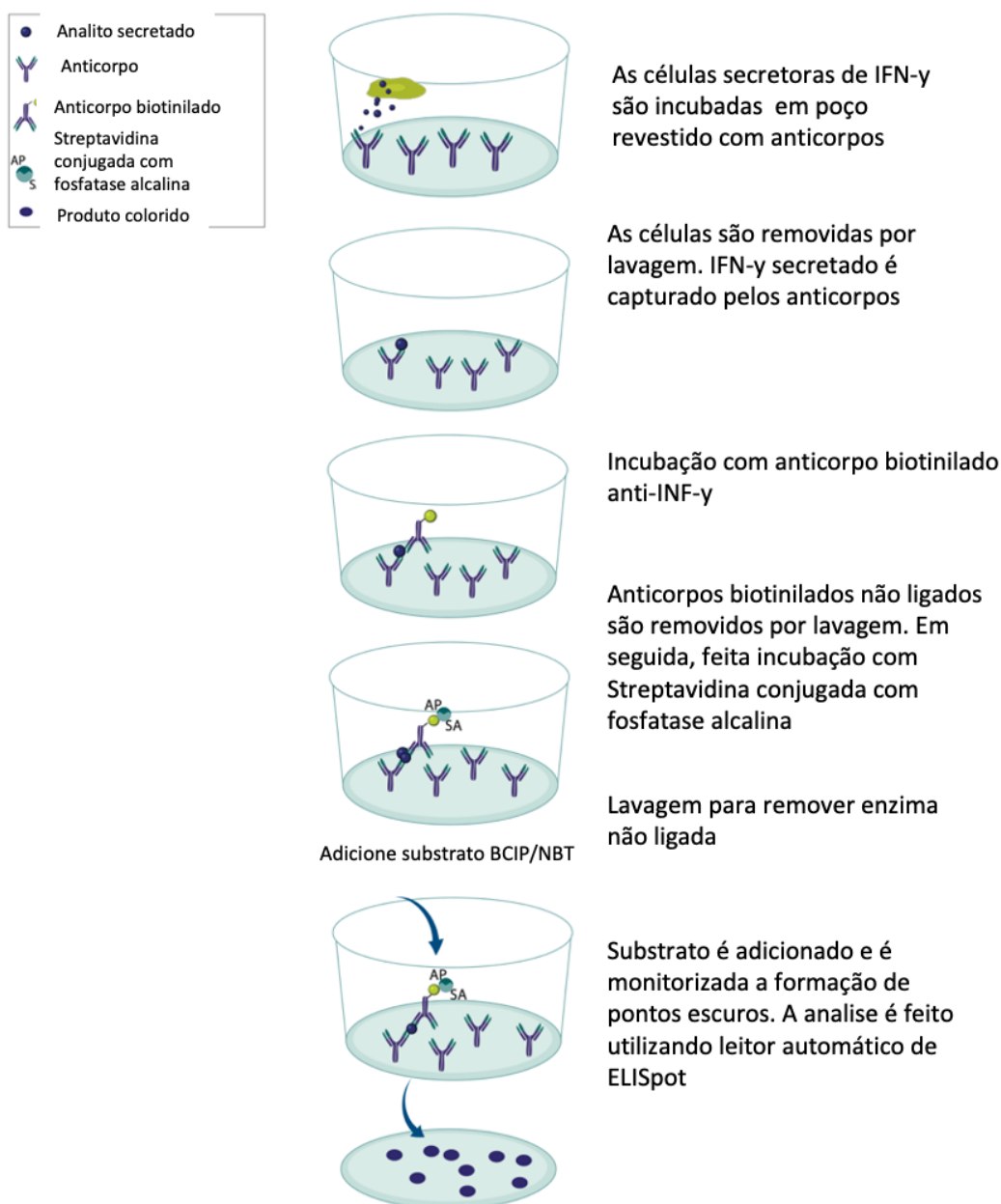
A placa de ELISpot foi incubada em estufa de CO₂ 5 a 37°C por 6h. Durante este período de incubação, o anticorpo liga-se ao IFN- γ secretado. Posteriormente, os poços foram aspirados e lavados 4 vezes com 250-300 μ L de tampão de lavagem. Todo o líquido foi removido entre cada lavagem, invertendo a placa sobre papel absorvente.

Em seguida, foi adicionado 100µL de anticorpo de detecção (anticorpo policlonal biotinilado específico para IFN- γ) em cada poço e incubado a placa a 2-8°C *overnight*. O procedimento de lavagem foi repetido e depois adicionado 100µL do concentrado A de estreptavidina AP em cada poço e incubado por 2h à temperatura ambiente. A estreptavidina-AP foi usada para detectar compostos biotinilados.

O procedimento de lavagem foi repetido novamente e então, adicionado 100µL do substrato BCIP/NBT em cada poço e nova incubação da placa por 1h à temperatura ambiente protegida da luz.

O substrato foi então decantado com água deionizada e todo o líquido removido dos poços. A placa foi invertida sobre papel absorvente até a completa secagem das membranas. Um precipitado de cor azul-preto se forma e aparece como manchas puntiformes nos locais de localização da citocina, com cada mancha individual representando uma célula secretora de IFN- γ individual. Os pontos são quantificados em leitor automático de ELISpot (AID – Advanced Imaging Devices GmbH Ebinger Str. 4 – D72479 Strassberg Germany) (Figura 4).

Os resultados foram relatados em contagem de *spots* (SPC) por 250.000 células. Os resultados não foram relatados se as contagens de células eram inferiores a 75.000 células por poço e/ou se o SPC de controle nulo fosse >10.



Demonstração das etapas da técnica de ELISpot.
Figura 4. Técnica de ELISpot

2.11 Citometria de fluxo

2.11.1 Protocolo para marcação de anticorpos para citometria

As amostras foram descongeladas lentamente e diluídas em tubo com meio de cultura PBS, centrifugadas 5min a 500G.

As células foram ressuspensas após centrifugação com 1mL de PBS.

Adicionado 2µL de solução de viabilidade (*violet viable dye* - BUV393).

Incubado em temperatura de 37°C por 15 minutos no escuro.

Células foram lavadas 2x com solução tampão, ressuspensas com PBS e feita a marcação conforme painéis de populações e memórias representados na tabela 1. Como controle de fluorescência foi utilizada a técnica de fluorescência menos um (FMO).

Tubo 1: não marcado;

Tubo 2: marcado com solução de viabilidade fluorescente em BUV395 (violeta);

Tubo 3: Marcado com painel de anticorpos de populações;

Tubo 4: FMO do painel de populações;

Tubo 5: Marcado com painel de anticorpos de memórias;

Tubo 6: FMO de painel de memórias.

Tabela 1. Painel de anticorpos de populações e memórias

Fluorocromos	Anticorpo/vol				
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Voltagem
FITC			CD19	CD19	513
			5µL	5µL	
PE			CD56	CD56	550
			3µL	3µL	
PE-CF594			CD3	CD3	600
			1µL	1µL	
PE-Cy7			NGK2D	FMO	679
			1µL		
PerCP-Cy5.5			CD45	CD45	650
			8µL	8µL	
APC			CD16		640
			1µL	FMO	
APC-CY7			CD4	CD4	620
			4µL	4µL	
Alexa 700			CD8	CD8	700
			2µL	2µL	
BV421			CD11b	CD11b	414
			1µL	1µL	
BV510			CD14	CD14	430
			1µL	1µL	
BUV395		VIOLETA 2µL	VIOLETA 2µL	VIOLETA 2µL	600
Fluorocromos	Anticorpo/vol				
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 5	Tubo 6	Voltagem
FITC			CD62L	FMO	513
			5µL		
PE			CD45RO	FMO	550
			5µL		
PE-CF594			CD3	CD3	

continua...

...continuação

PE-Cy7		1µL	1µL	600
		CD127	CD127	
PerCP-Cy5.5		1µL	1µL	679
		CD45	CD45	
APC		8µL	8µL	650
		CD25	FMO	
APC-CY7		20µL		640
		CD4	CD4	
Alexa 700		4µL	4µL	620
		CD8	CD8	
BV421		6µL	6µL	700
		CD45RA	CD45RA	
BV510		2µL	2µL	414
		CCR7	FMO	
BV605		2µL		430
		CD27	FMO	
BV650		1µL		600
		CD28	FMO	
BUV395		1µL		554
	VIOLETA	VIOLETA	VIOLETA	
	2µL	2µL	2µL	600

Para determinar a reconstituição dos subtipos de memória de linfócitos foi utilizado o esquema abaixo:

Classificação dos subtipos de linfócitos T de acordo com sua expressão, representado na tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos subtipos de linfócitos T de acordo com sua expressão

CD4	Naive	Transição	Memória
CD45RA	+	+/0	0
CD45RO	0	+/0	+
CD8	Naive	Transição	Memória
CD45RA	+	+/0	0
CD45RO	0	+/0	+

As especificações de anticorpos utilizados estão representadas na tabela 3.

Tabela 3. Especificações de anticorpos utilizados

Anticorpo	Marca	Catálogo	Clone
CD19 - FITC	BD	347543	4G7
CD56 - PE	Miltenyi	130-100-653	REA196
CD3 – PE-CF594	BD	562280	UCHT1
CD314 (NKG2d) - PE-Cy7	BD	562365	1D11
CD45 - PercP Cy5.5	BD	340953	2D1
CD16 - APC	BD	561304	B73.1
CD4 - APC-Cy7	BD	341095	SK3

continua...

...continuação			
CD8 - Alexa 700	BD	561453	RPA-T8
CD11b - BV421	BD	566313	CBRM1/5
CD14 - BV510	BD	563079	MφP9
CD62L - FITC	BD	347443	SK11
CD45RO - PE	BD	555493	UCHL1
CD127 - PE-Cy7	BD	560822	HIL-7R-M21
CD25 - APC	BD	555434	M-A251
CD45RA - BV421	BD	562885	HI100
CD197 (CCR7) BV510	BD	563449	3D12
CD27 - BV605	BD	562655	L128
CD28 - BV650	BD	742528	L293
Violeta - BUV 393	BD	566332	

Após a adição dos anticorpos de superfície, as células incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, seguida por lavagem com solução tampão. As células então foram ressuspensas e adquiridas utilizando o citômetro de fluxo LSR II - FORTESSA (BD Biosciences). Os resultados foram analisados utilizando o *software* FlowJo.

Os números absolutos de células foram derivados através de ensaio de plataforma dupla, em que os números de linfócitos T, B, NK e monócitos foram avaliados em citometria de fluxo em porcentagem de células e calculadas por meio da contagem de leucócitos derivado de analisador de células hematológicas padronizado da mesma amostra utilizada para realização de citometria.

Além disso, foi realizada análise dos dados de dois pacientes (um do Grupo ATG e outro do Grupo Ciclofosfamida), através da plataforma Cytobank⁽¹⁰²⁾ para apoiar e ilustrar os resultados da citometria de fluxo. Nessa análise, os dados de citometria de fluxo gerados foram carregados na plataforma Cytobank e foram aplicadas estratégias de seleção para identificar linfócitos T, B, NK e monócitos, além de linfócitos T CD4 e CD8 *naïve*, transição e memória. Além disso, foram realizadas etapas de compensação para garantir a qualidade e consistência dos dados. Os dados analisados foram demonstrados através de gráficos para visualização da distribuição das células de interesse.

2.12 Desfechos estudados

O desfecho primário foi avaliação de recuperação imune B, T, NK e linfócitos T CMV-específicos em pacientes submetidos a transplante alogênico não aparentado utilizando ciclofosfamida pós-transplante ou ATG.

Os desfechos secundários estudados foram sobrevida global, incidência cumulativa de TRM, mortalidade em 100 dias, DECH, reativação e doença por CMV. Sobrevida global foi definida como sobrevida da data de transplante até a data do óbito por qualquer causa, com os pacientes vivos no momento da análise sendo censurados. Um paciente que veio a óbito foi definido como mortalidade não relacionada a recaída (NRM) se o paciente não apresentou recidiva/progressão da doença previamente ao óbito, independente da causa de óbito. A DECH será classificada de acordo com critérios de Glucksberg.

2.13 Análise estatística

Variáveis categóricas foram resumidas usando frequência e porcentagem, enquanto variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão, ou mediana e desvio padrão, juntamente com o número de observações válidas.

Para comparar grupos em relação às variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-Quadrado ou o teste Exato de Fisher, conforme apropriado. Para comparar grupos em relação às variáveis contínuas, foi utilizado o teste *t* de Student paramétrico, se aplicável, ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A sobrevida global foi definida a partir da data do transplante até a morte do paciente, e foi estimada usando o método de Kaplan-Meier, com os pacientes vivos no momento da coleta de dados sendo censurados. O teste de *log-rank* foi utilizado para a comparação das curvas de sobrevida. Curvas de incidência acumulada (mortalidade não relacionada ao transplante e recidiva) foram construídas com o método de Gray. Para a recidiva, a mortalidade não relacionada ao transplante foi considerada como evento concorrente, e vice-versa. Para análises univariadas e multivariadas de desfechos de sobrevida, utilizamos o modelo de Cox. Valores estatisticamente significativos foram definidos com valores- $p \leq 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software* estatístico R (Viena, Áustria), versão 4.3.2.

3 RESULTADOS

3.1 População

As características demográficas da população incluída e seus doadores estão relatadas na tabela 4.

Tabela 4. Características dos pacientes incluídos

Variável		ATG N=20	Ciclofosfamida N=16	Valor-p
Idade, anos	Mediana [range]	45 [2-76]	37,8 [3-66]	0,319
Performance status	Karnofsky entre 90-100 [%]	14 [70]	14 [87,5]	0,558
	LMA	7 [35%]	5 [31%]	0,479
	SMD	4 [20%]	4 [25%]	
	LLA	2 [10%]	4 [25%]	
Doença de base	LMC	2 [10%]	3 [18,7%]	
	Linfoma não Hodgkin	1 [5%]	2 [12,5%]	
	Outro	1 [5%]	2 [12,5%]	
	1ª RC	13 [65%]	12 [75%]	0,872
Status da doença de base	2ª RC	2 [10%]	1 [6,2%]	
	Em atividade	5 [25%]	3 [18,8%]	
Status sorológico	Paciente IgG+	19 [95%]	14 [87,5%]	1,00
CMV	Doador IgG+	18 [90%]	14 [87,5%]	
Regime de condicionamento	Mieloablativo	12 [60%]	14 [87,5%]	0,133
	RIC	8 [40%]	2 [12,5%]	
Fonte enxerto	Medula óssea	9 [45%]	10 [62,5%]	0,296
	Sangue periférico	11 [55%]	6 [37,5%]	
Células infundidas	CD34 x10 ⁶ /Kg	5,4 [1,54-9]	4,6 [1,81-9,15]	0,286
Idade do doador	Mediana [range]	33,1 [19-55]	33,7 [22-49]	0,833
Sexo doador	Masculino	17 [85%]	10 [62,5%]	0,146

Foram incluídos 36 pacientes nesse estudo, no período de 10 de janeiro de 2019 a 1 de maio de 2021. Dos pacientes incluídos, 25 também participaram do estudo realizado de forma concomitante em nosso serviço (ClinicalTrials.gov ID NCT03818334), e 11 pacientes foram tratados no mesmo período com protocolo baseado em ATG em nosso serviço. A mediana de idade dos pacientes foi de 45 anos no grupo de pacientes que recebeu ATG e 37,8 anos no grupo que recebeu ciclofosfamida ($p=0,319$). Com relação a *performance status* dos pacientes, 70% dos pacientes do Grupo ATG e 87,5% do Grupo Ciclofosfamida apresentavam Karnofsky entre 90 e 100 ($p=0,257$).

Com relação ao diagnóstico de base, todos os pacientes apresentavam doenças onco-hematológicas, sendo que, no grupo que recebeu ATG 7

pacientes (35%) tinham diagnóstico de LMA, 4 (20%) com SMD, 4 (20%) LLA, 2 (10%) com leucemia mieloide crônica (LMC), 1 (5%) com linfoma não Hodgkin e 1 (5%) com neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blástica. No grupo de pacientes que receberam ciclofosfamida, 5 (31,25%) tinham diagnóstico de LMA, 4 (25%) com LLA, 3 (18,7%) com LMC, 2 (12,5%) com linfoma não Hodgkin, 1 (6,25%) com leucemia mielomonocítica crônica e 1 (6,25%) com neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blástica ($p=0,479$). Com relação ao *status* de resposta da doença de base no momento do transplante, 65% do Grupo ATG e 75% do Grupo Ciclofosfamida estavam em 1ª remissão completa, 10% do Grupo ATG e 6,25% do Grupo Ciclofosfamida estavam em 2ª remissão completa e 25% do Grupo ATG e 18,8% do Grupo Ciclofosfamida não estavam em remissão ($p=0,872$).

Com relação ao *status* sorológico para CMV, não foram incluídos os casos em que ambos os paciente e doador tinham sorologia IgG negativa. No Grupo ATG, 19/20 (95%) dos pacientes era CMV IgG positivo e 18/20 (90%) dos doadores era CMV IgG positivo, enquanto no Grupo Ciclofosfamida 14/16 (87,5%) dos pacientes eram CMV IgG positivo e 14/16 (87,5%) ($p=1,00$) dos doadores eram CMV IgG positivo ($p=1,00$).

Com relação aos dados do transplante, condicionamento mieloablativo foi utilizado em 60% dos casos no Grupo ATG e 87,5% dos casos no Grupo Ciclofosfamida, enquanto regime de intensidade reduzida foi utilizada em 40% dos casos no Grupo ATG e 12,5% do Grupo Ciclofosfamida ($p=0,133$). Fonte medula óssea foi utilizada em 45% dos casos no Grupo ATG e 62,5% no Grupo Ciclofosfamida, enquanto sangue periférico foi utilizado em 55% do Grupo ATG e 37,5% do Grupo Ciclofosfamida ($p=0,296$). A mediana de células CD34 infundidas foi de $5,4 \times 10^6/\text{Kg}$ do paciente no Grupo ATG e $4,6 \times 10^6/\text{Kg}$ do paciente no Grupo Ciclofosfamida ($p=0,296$).

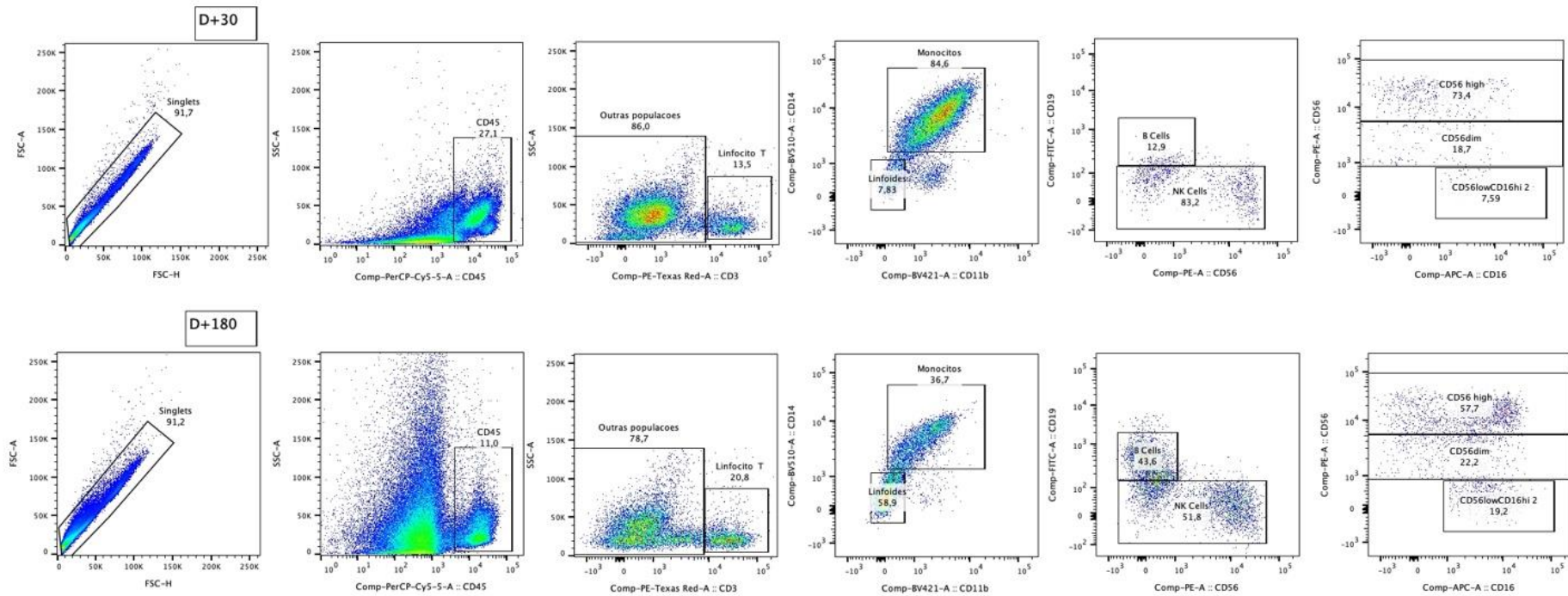
Com relação aos dados do doador, todos os casos incluídos foram submetidos a transplante com doador não aparentado. No Grupo ATG, todos os pacientes apresentavam compatibilidade 10/10 com seu doador, enquanto, no Grupo Ciclofosfamida, 14/16 (87,5%) eram 100% compatíveis e 2 pacientes apresentavam compatibilidade 9/10 com seu doador. A mediana de idade do doador no Grupo ATG foi de 33,1 anos e no Grupo Ciclofosfamida foi de 33,7 anos ($p=0,833$). O doador era do sexo masculino em 85% dos casos no Grupo ATG e 62,5% dos casos do Grupo Ciclofosfamida ($p=0,146$).

3.2 Desfecho primário

Foram avaliadas amostras pré-transplante, D+30, D+60, D+90 e D+180 com relação a recuperação imunológica de linfócitos B, T e NK CMV-específica com técnica de ELISpot.

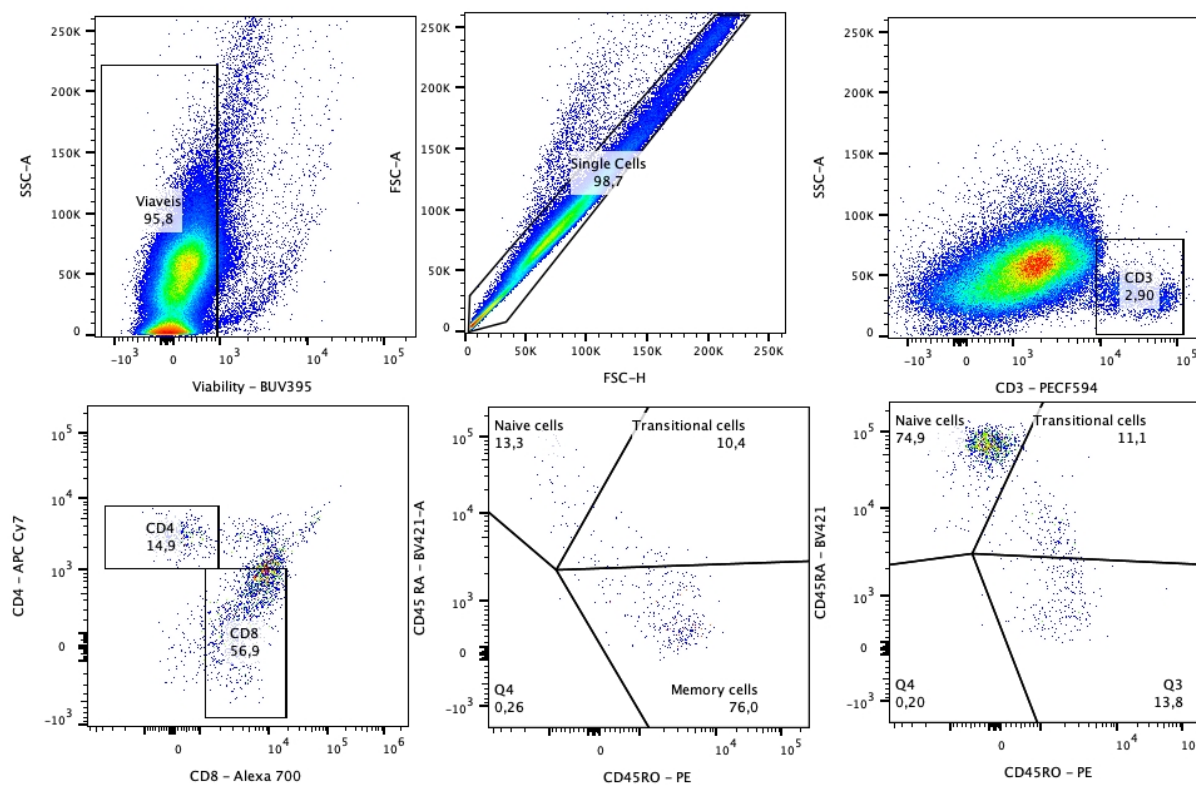
3.3 Recuperação imunológica por citometria

Foram realizadas análises através de citometria através de 2 painéis (populações e memória) conforme exemplo do caso abaixo (Figuras 5 e 6):



Representação de um exemplo de análise do “painel de população”, realizado por meio do programa FlowJo.

Figura 5. Análise dos painéis de populações



Representação de um exemplo de análise do “painel de memórias”, realizado por meio do programa FlowJo.

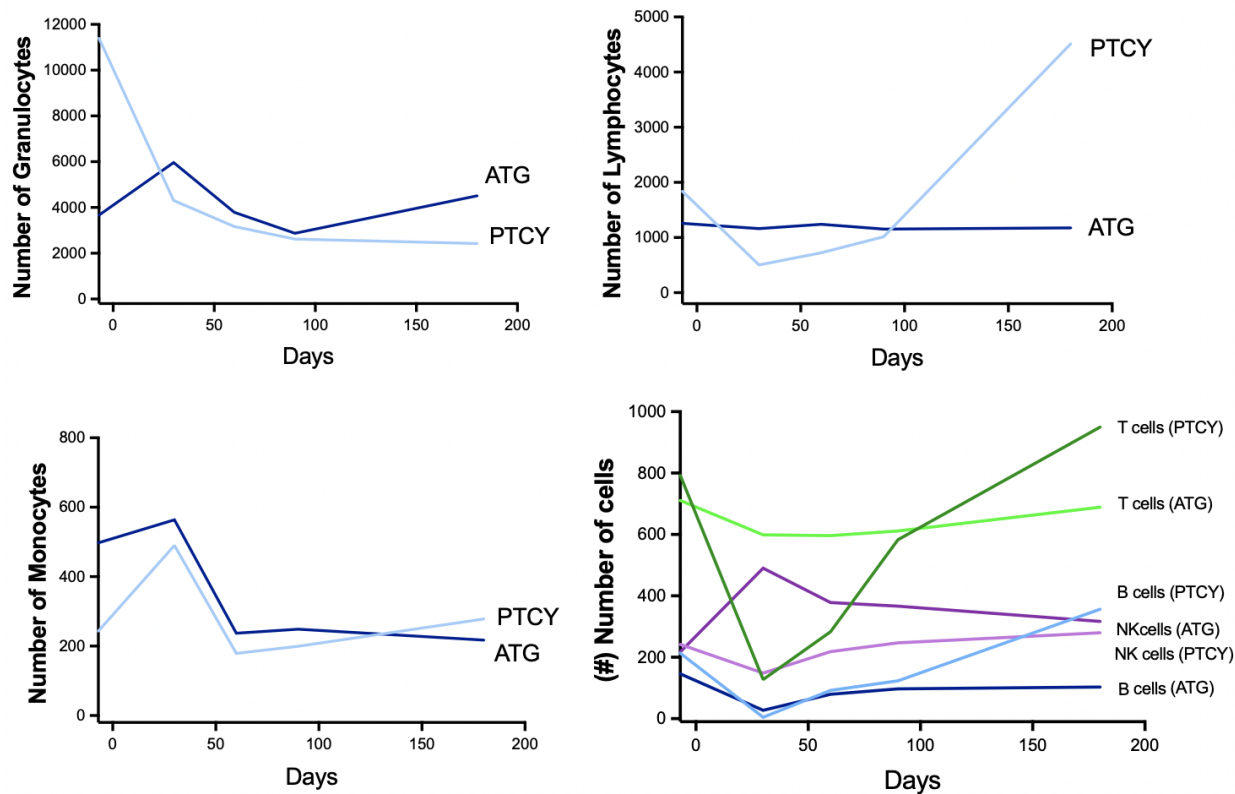
Figura 6. Análise dos painéis de memórias

O perfil de células linfomononucleares está representado na tabela 5 e figura 7.

Trinta e seis pacientes tiveram análises pré-transplante, 34 foram analisados no D+30 e D+60, 32 foram analisados no D+90 e 27 no D+180. Não houve diferença entre os grupos ATG e Ciclofosfamida com relação ao perfil de células linfomononucleares pré-transplante. No D+30, no Grupo ATG, houve maior porcentagem e maior número absoluto de linfócitos T (mediana 238 *versus* 82cels/ μ L, $p=0,022$), linfócitos B (17 *versus* 2cels/ μ L, $p=0,004$) e células NK (385 *versus* 96cels/ μ L, $p<0,001$) quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida. No D+180 houve diferença com relação ao número absoluto de linfócitos B entre os grupos ATG e Ciclofosfamida, sendo maior no Grupo Ciclofosfamida (54 *versus* 282cels/ μ L $p=0,003$) e percentualmente maior número de células NK no Grupo ATG, sem diferença quando avaliados números absolutos (Figuras 7 a 10).

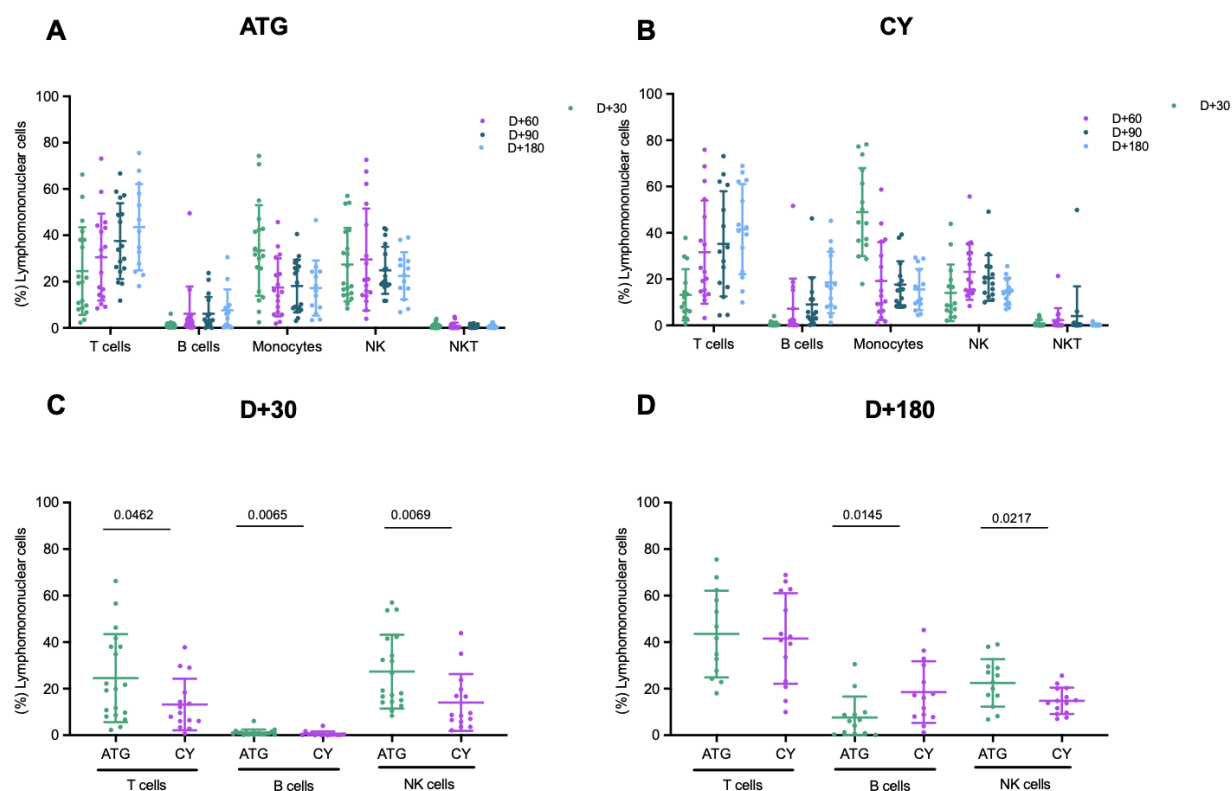
Tabela 5. Perfil de células linfomononucleares

Variável		ATG	Ciclofosfamida	Valor-p
		Células/ μ L- mediana [DP]	Células/ μ L mediana [DP]	
Pré	Monócitos	156[45-294]	202[136-303]	0,466
	Linfócitos T	648[417-971]	717[314-1141]	0,890
	Linfócitos B	42[16-183]	166[3-372]	0,835
	NK	126[90-242]	146[60-294]	0,972
D+30	Monócitos	379[212-477]	892[469-1362]	0,037
	Linfócitos T	238[111-801]	82[47-160]	0,022
	Linfócitos B	17[4-27]	2[1-7]	0,004
	NK	385[241-718]	96[59-196]	<0,001
D+60	Monócitos	204[74-386]	299[132-422]	0,488
	Linfócitos T	406[174-717]	190[110-420]	0,100
	Linfócitos B	50[13-60]	16[4-98]	0,338
	NK	319[184-597]	203[128-278]	0,074
D+90	Monócitos	192[127-387]	289[117-588]	0,428
	Linfócitos T	368[263-839]	359[140-886]	0,597
	Linfócitos B	37[14-81]	50[22-130]	0,571
	NK	282[185-440]	221[146-311]	0,082
D+180	Monócitos	195[83-361]	144[77-557]	0,790
	Linfócitos T	513[304-602]	925[431-1416]	0,344
	Linfócitos B	54[13-87]	282[138-553]	0,003
	NK	294[198-517]	257[155-245]	0,790



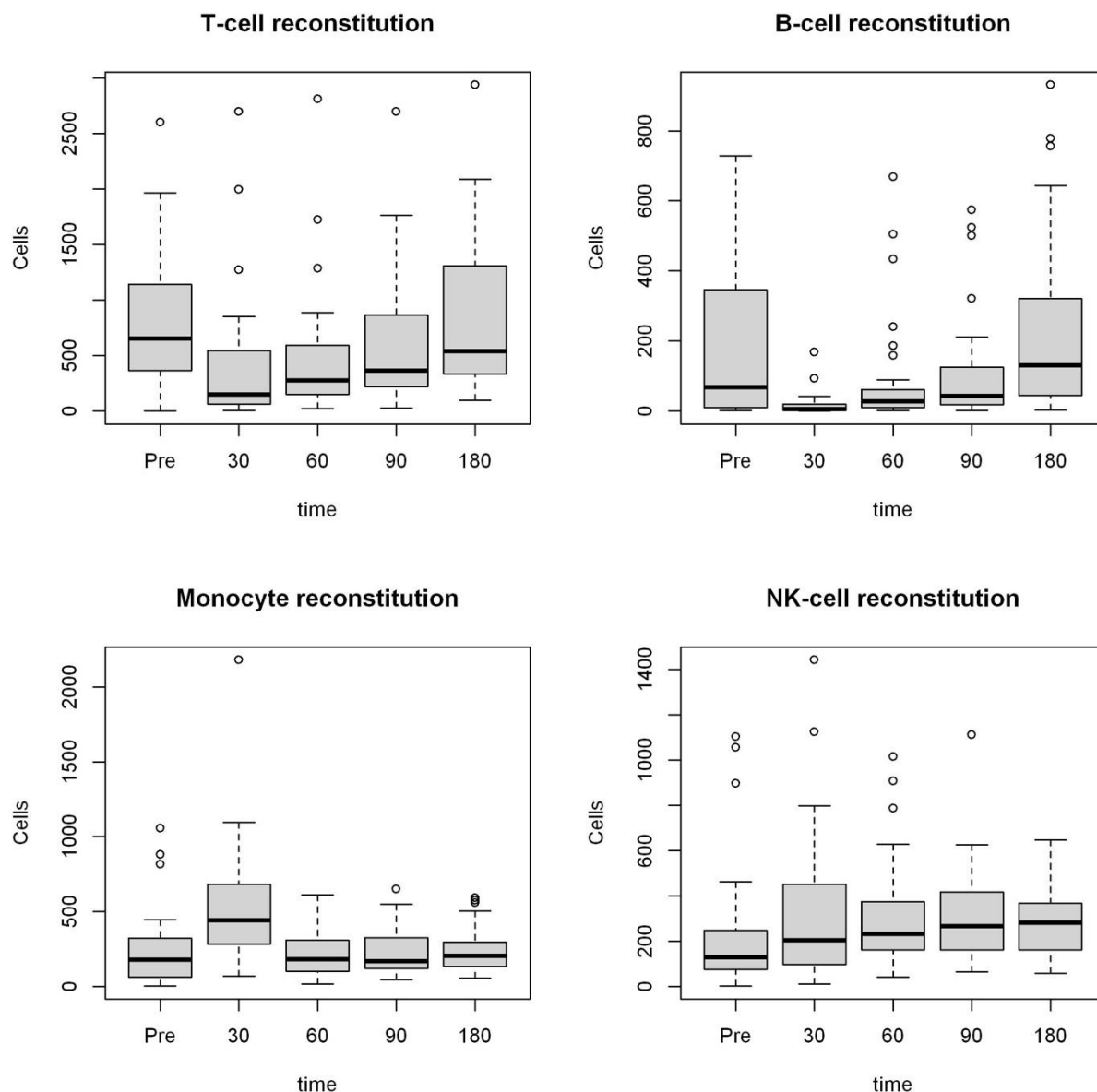
Distribuição de granulócitos, linfócitos e monócitos demonstrando aumento precoce de granulócitos e monócitos já no D+30 em ambos os grupos. Reconstituição de linfócitos mais precoce no **Grupo** ATG, porém com maior aumento de linfócitos no grupo PTCy após o D+100. Há redução precoce importante dos linfócitos T, B e NK no grupo PTCy no D+30, enquanto houve recuperação de linfócitos no D+180.

Figura 7. Distribuição de granulócitos, linfócitos, monócitos e linfócitos T, B e NK



(A) Distribuição das populações linfócitos T, B e NK para ATG (B) Distribuição das populações linfócitos T, B e NK para ciclofosfamida (C) Comparação entre os dois tratamentos para linfócitos T, B e NK no D+30 (D) Comparação entre os dois tratamentos para linfócitos T, B e NK no D+180.

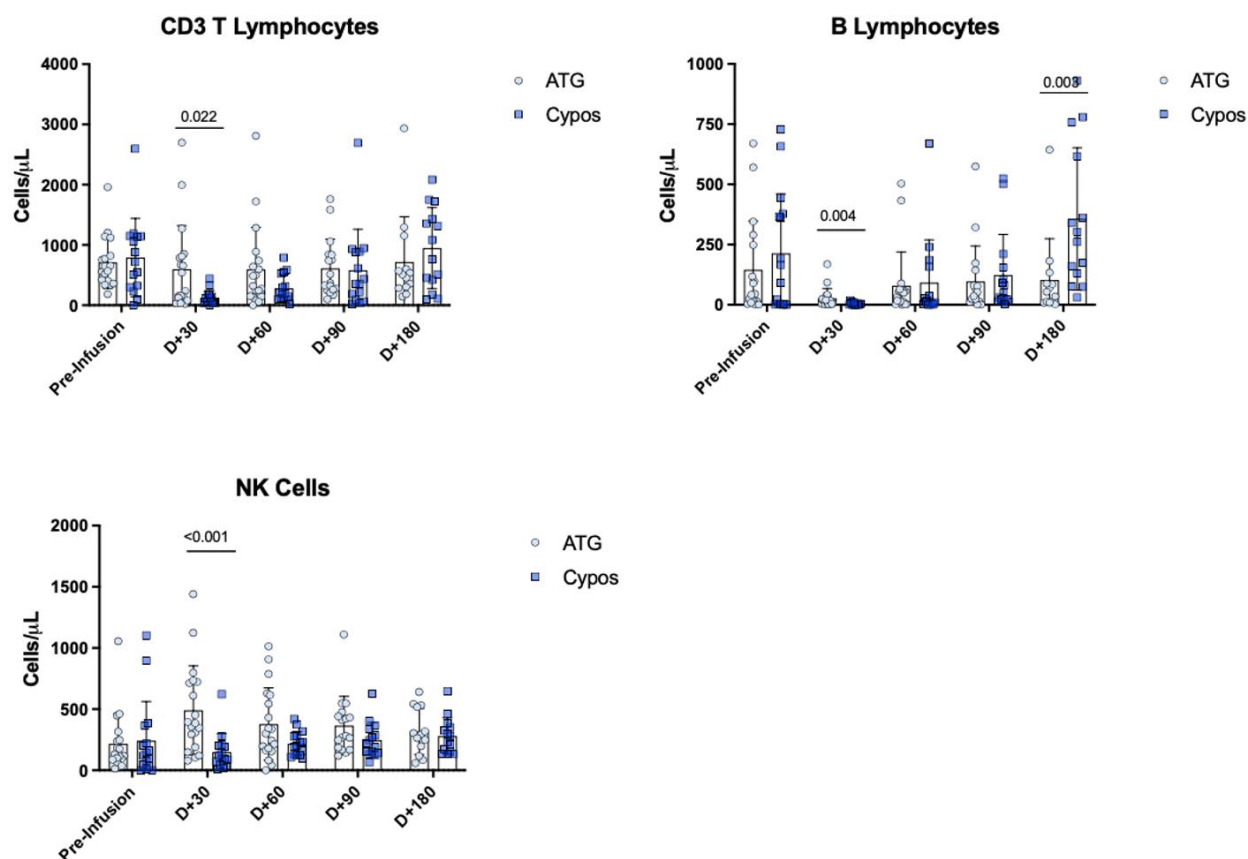
Figura 8. Perfil de linfócitos T, B e NK nos dias +30, +60, +90 e +180



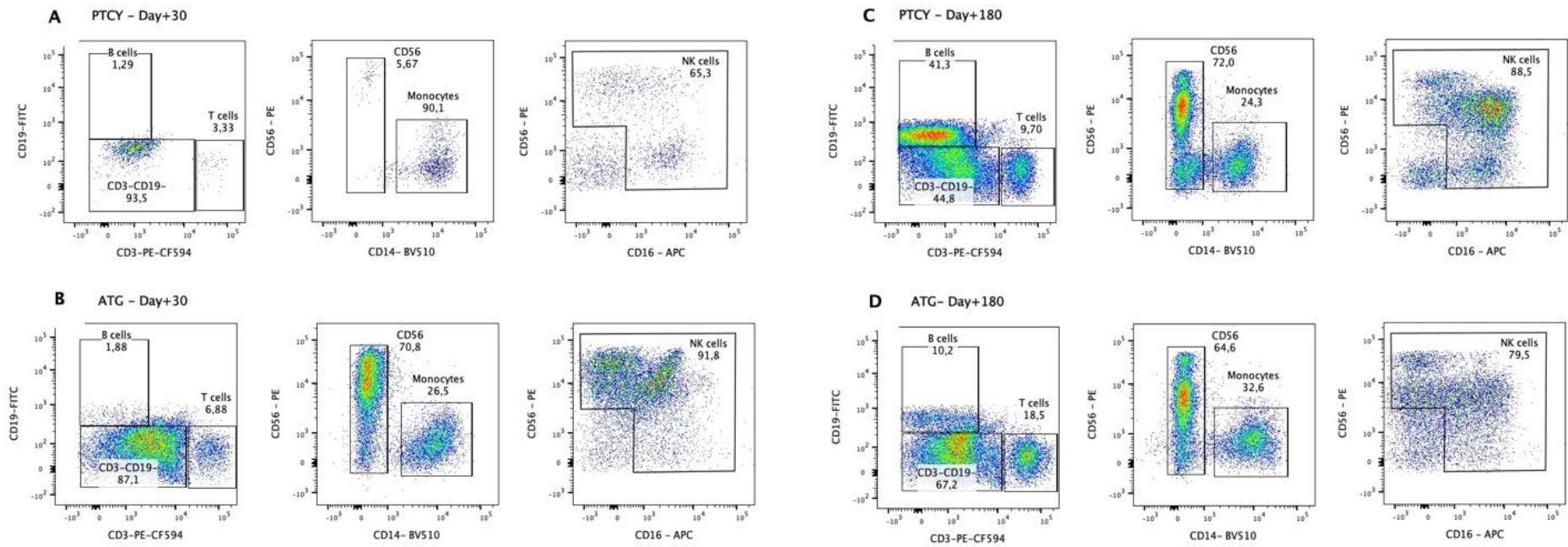
Distribuição de linfócitos demonstrando reconstituição lenta de linfócitos T e B, enquanto ocorre reconstituição precoce de monócitos e células NK.

Figura 9. Distribuição das populações linfócitos T, B e NK e monócitos em números absolutos nos dias pré-TMO, +30, +60, +90 e +180

Exemplo de caso de citometria de pacientes que utilizaram ATG ou ciclofosfamida estão representados na figura 11.



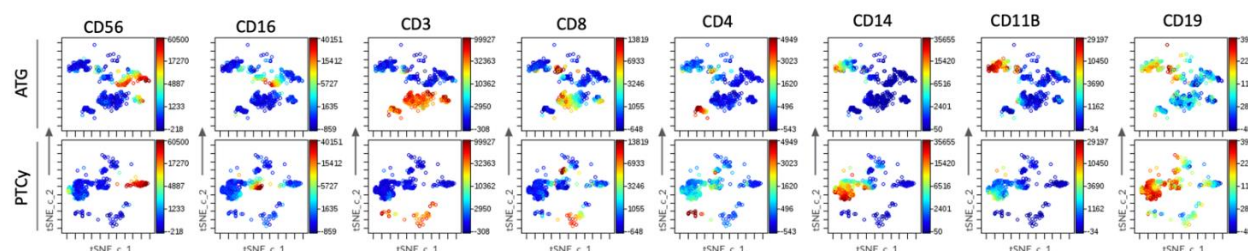
Comparando os subgrupos, houve maior número de linfócitos T, B e NK no D+30 no Grupo ATG comparado ao grupo PTCY. Não houve diferenças com significância estatística entre os grupos no D+60 e D+90, porém, no D+180 houve maior número de linfócitos B no grupo PTCy comparado ao Grupo ATG. **Figura 10.** Distribuição das populações de linfócitos T, B, NK em números absolutos por profilaxia utilizada nos dias pré-TMO, +30, +60, +90 e +180



A. Caso de PTCy no D+30; B. Caso de ATG no D+30 demonstrando maior número de linfócitos T, B e NK no paciente que recebeu ATG; C. Caso de PTCy no D+180; D. Caso de ATG no D+180, demonstrando maior número de linfócitos B no paciente que recebeu PTCy.

Figura 11. Casos de citometria de pacientes que utilizaram ciclofosfamida ou ATG nos dias +30 e +180

Dois casos ilustrativos de pacientes dos grupos ATG e Ciclofosfamida no D+30, utilizando a plataforma Cytobank, estão representados na figura 12.



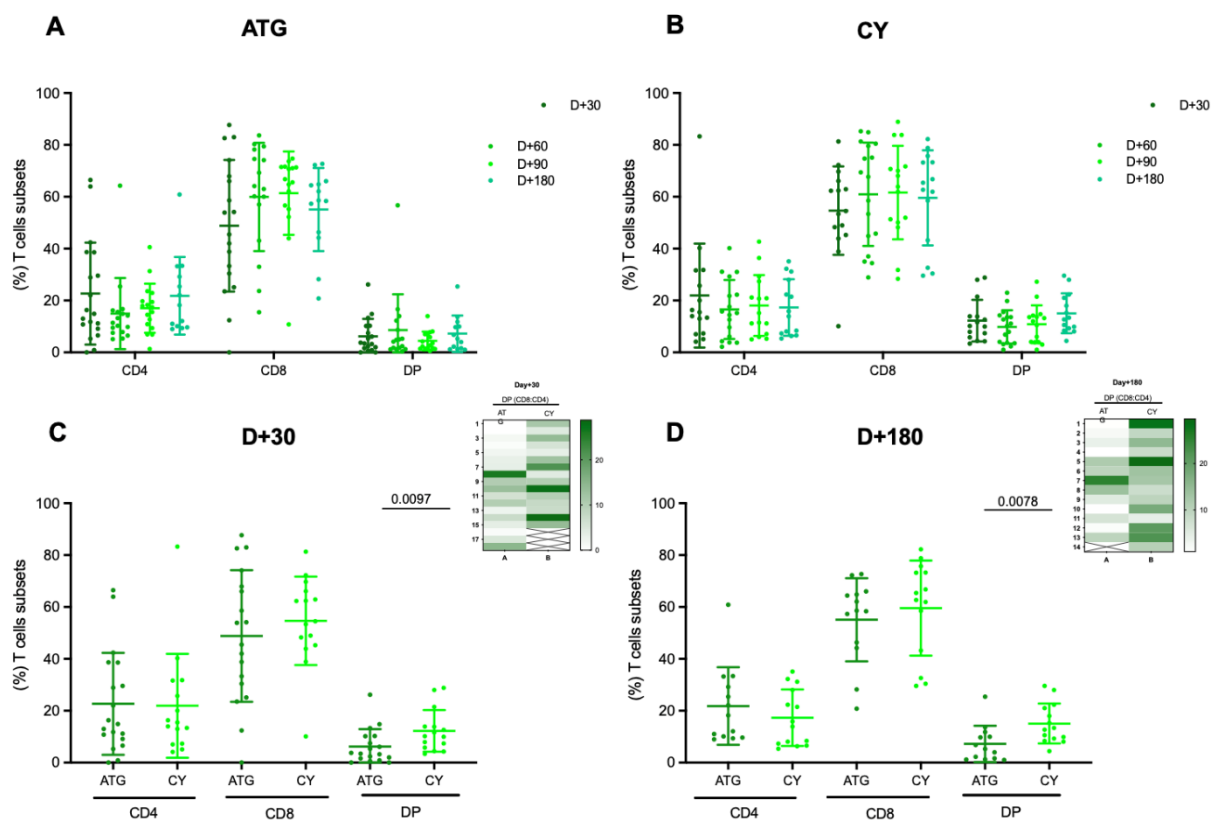
Grupos de células da plataforma Cytobank mostrando diferenças entre 2 pacientes, um que recebeu globulina antitimocítica (ATG) e outro que recebeu ciclofosfamida pós-transplante (PTCy) no dia +30. No paciente com ATG há maior agregado de células NK CD56+, maior agregado de células T CD3+, representado principalmente por células CD8+, enquanto no paciente que recebeu PTCy, é possível visualizar maior população de monócitos CD14+ e CD11b+.

Figura 12. Análise através da plataforma Cytobank de dois pacientes que utilizaram ciclofosfamida ou ATG no dia +30

Os subtipos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão representados na tabela 6. Foi observado predomínio de linfócitos T CD8⁺ quando comparado ao linfócito T CD4⁺ desde fases precoces do transplante, permanecendo até D+180, nos 2 grupos analisados. Observamos uma população de linfócitos T duplo positivos CD4⁺ e CD8⁺ maior no Grupo da Ciclofosfamida, quando comparado ao ATG (21 *versus* 98cels/ μ L, $p=0,003$), representado na tabela 6, figuras 13 e 14.

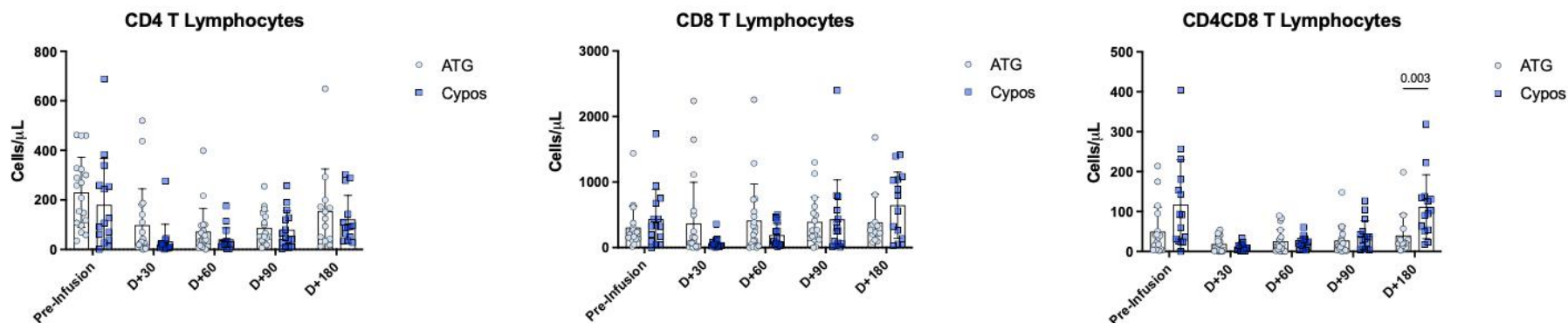
Tabela 6. Perfil de linfócitos T

Variável		ATG	Ciclofosfamida	Valor-p
		Células/ μ L mediana [DP]	Células/ μ L mediana [DP]	
Pré	CD4 ⁺ CD8 ⁻	285[113-312]	107[50-257]	0,127
	CD8 ⁺ CD4 ⁻	219[144-242]	325[130-559]	0,466
	CD4 ⁺ CD8 ⁺	34[10-47]	91[29-167]	0,048
D+30	CD4 ⁺ CD8 ⁻	28[12-125]	13[6-24]	0,083
	CD8 ⁺ CD4 ⁻	82[21-435]	47[22-83]	0,270
	CD4 ⁺ CD8 ⁺	14[3-39]	8[5-16]	0,551
D+60	CD4 ⁺ CD8 ⁻	44[22-92]	23[20-32]	0,116
	CD8 ⁺ CD4 ⁻	316[103-550]	95[48-324]	0,174
	CD4 ⁺ CD8 ⁺	17[7-36]	20[13-28]	0,970
D+90	CD4 ⁺ CD8 ⁻	56[47-132]	49[20-125]	0,521
	CD8 ⁺ CD4 ⁻	265[159-550]	255[68-505]	0,514
	CD4 ⁺ CD8 ⁺	17[6-35]	33[10-47]	0,260
D+180	CD4 ⁺ CD8 ⁻	125 [43-173]	91[54-135]	0,827
	CD8 ⁺ CD4 ⁻	240[202-353]	678[170-1035]	0,320
	CD4 ⁺ CD8 ⁺	21[14-30]	98[57-134]	0,003



(A) Distribuição das populações linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e DP no grupo que recebeu ATG; (B) Distribuição das populações linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e DP no grupo que recebeu PTCy; (C) Comparação dos grupos ATG e CY com relação a linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e DP no D+30; (D) Comparação dos grupos ATG e CY com relação a linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e DP no D+180.

Figura 13. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos grupos ATG e Ciclofosfamida



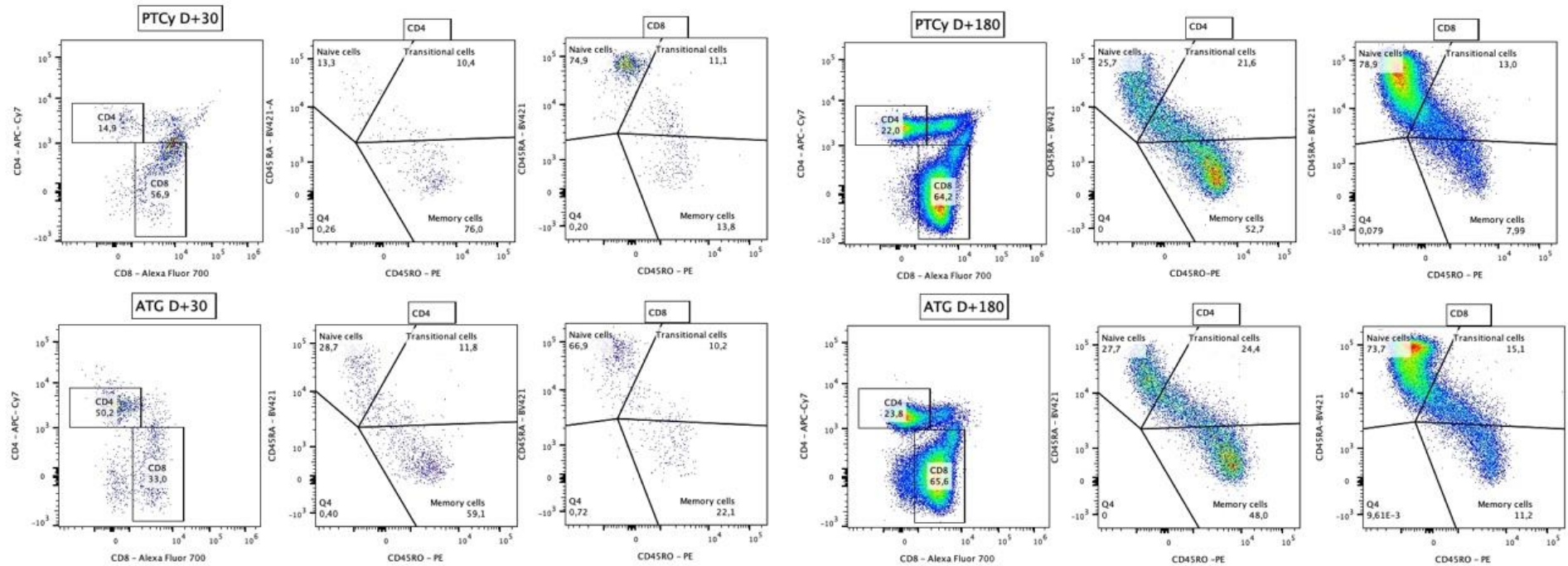
Distribuição de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e DP nos dias pré-TMO, +30, +60, +90 e +180 pós-transplante nos grupos de pacientes que receberam ATG ou ciclofosfamida (CY) pós-transplante em números absolutos, demonstrando inversão da relação CD4/CD8 em ambos os grupos e maior número de células DP no Grupo Ciclofosfamida no D+180.

Figura 14. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos grupos ATG e Ciclofosfamida em números absolutos

Os perfis de maturação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ estão representados na tabela 7 e a representação de 2 casos de citometria com análise dos subgrupos de células T na figura 15.

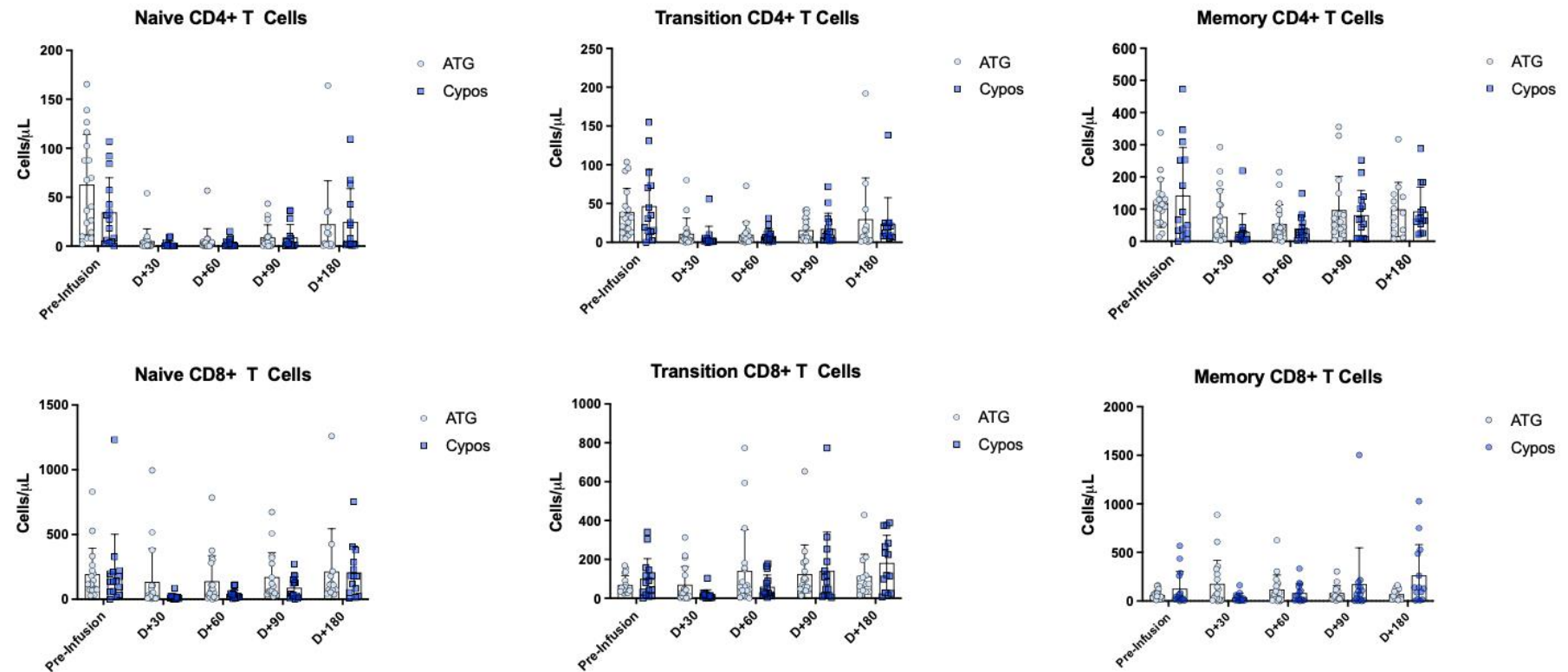
Tabela 7. Subtipos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

Variável		ATG	Ciclofosfamida	Valor-p
		Células/ μ L mediana [DP]	Células/ μ L mediana [DP]	
Pré	CD4 ⁺ memória	114[77-148]	66[29-253]	0,579
	CD4 ⁺ <i>naïve</i>	40[16-95]	27[5-50]	0,119
	CD4 ⁺ transição	31[18-47]	31[14-72]	0,972
	CD8 ⁺ memória	47[35-82]	37[20-171]	0,703
	CD8 ⁺ <i>naïve</i>	128[77-242]	139[59-204]	0,652
	CD8 ⁺ transição	44 [38-110]	81[81-131]	0,945
D+30	CD4 ⁺ memória	100[36.2-157]	78[21-168]	0,795
	CD4 ⁺ <i>naïve</i>	3[0.7-13]	3[0.8-5]	0,728
	CD4 ⁺ transição	9[2-31]	8[4-25]	0,972
	CD8 ⁺ memória	108[79-233]	120[34-315]	0,959
	CD8 ⁺ <i>naïve</i>	103[38-145]	41[25-100]	0,188
	CD8 ⁺ transição	54[28-90]	79[23-129]	0,488
D+60	CD4 ⁺ memória	61[43-82]	42[24-167]	0,945
	CD4 ⁺ <i>naïve</i>	3[2-15]	5[0.6-10]	0,781
	CD4 ⁺ transição	8[4-17]	18[4-36]	0,386
	CD8 ⁺ memória	98[62-165]	97[60-257]	0,677
	CD8 ⁺ <i>naïve</i>	108[48-209]	77[39-153]	0,405
	CD8 ⁺ transição	106[84-162]	108[42-241]	0,945
D+90	CD4 ⁺ memória	98[73-119]	91[34-172]	0,970
	CD4 ⁺ <i>naïve</i>	5[0.7-21]	7[1-12]	0,623
	CD4 ⁺ transição	12[6-35]	18[9-50]	0,650
	CD8 ⁺ memória	97[53-148]	67[53-166]	0,880
	CD8 ⁺ <i>naïve</i>	106[73-259]	82[52-154]	0,257
	CD8 ⁺ transição	114[78-130]	167[74-214]	0,257
D+180	CD4 ⁺ memória	122[48-160]	57[25-120]	0,320
	CD4 ⁺ <i>naïve</i>	12[0.8-27]	7[2-15]	0,698
	CD4 ⁺ transição	8[4-27]	12[7-18]	1,000
	CD8 ⁺ memória	63[46-124]	108[38-243]	0,512
	CD8 ⁺ <i>naïve</i>	133[72-408]	117[66-152]	0,903
	CD8 ⁺ transição	112[69-167]	93[33-254]	0,903



Casos de citometria de perfil de linfócitos T de pacientes que receberam PTCy ou ATG demonstram menor número de linfócitos T em ambos os grupos no D+30 comparado ao D+180, com predomínio de linfócitos T CD4+ de memória e maior número de linfócitos T CD8+naive em ambos os grupos.

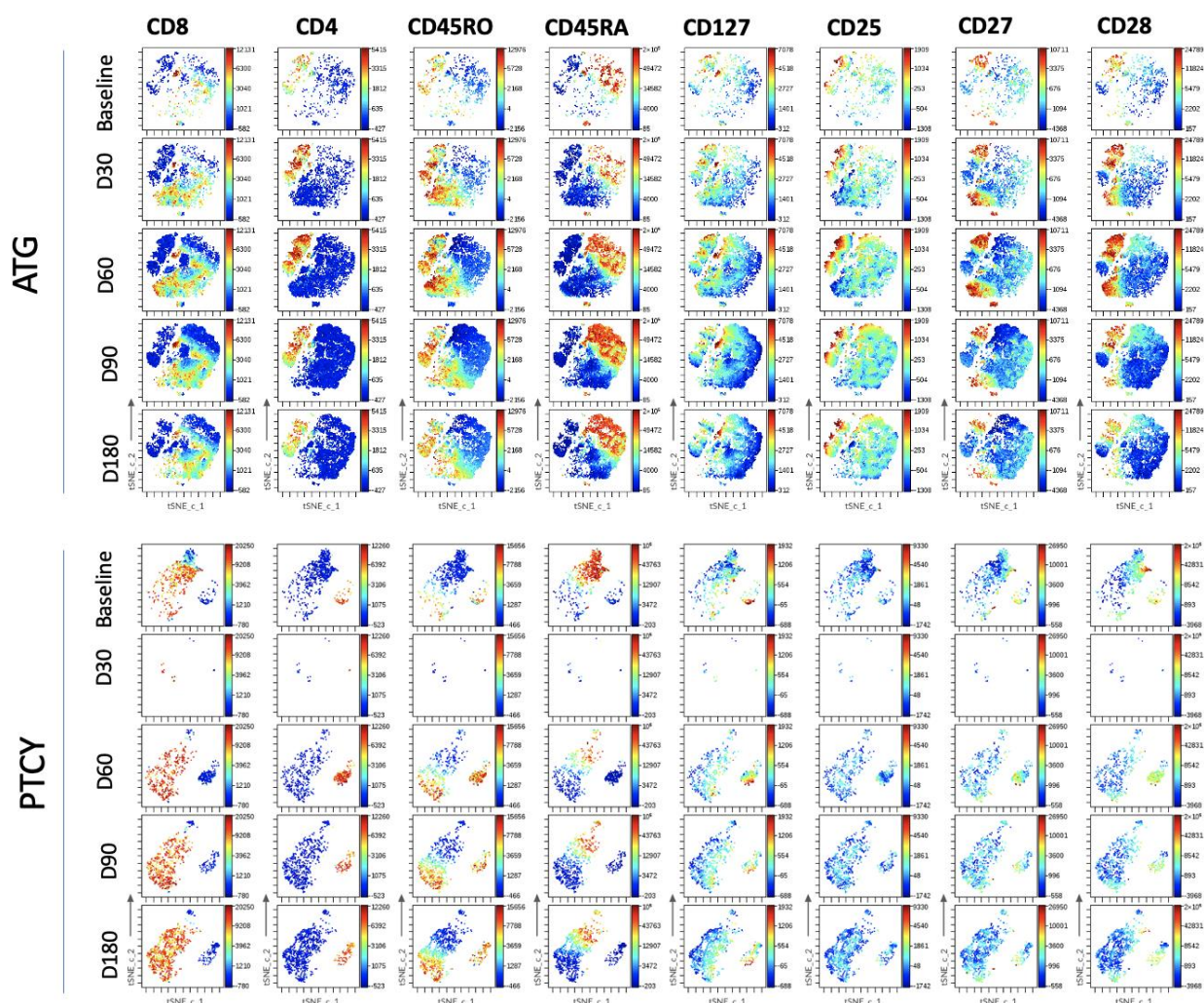
Figura 15. Casos de citometria de perfil de linfócitos T de pacientes que receberam PTCy ou ATG nos D+30 e D+180



Distribuição de linfócitos T demonstrando predomínio de linfócitos T CD4+ de memória em ambos os grupos e aumento de linfócitos T CD8+ de transição de *naïve* no D+60, D+90 e D+180 em ambos os grupos.

Figura 16. Perfil de linfócitos T CD4+ *naïve*, transição e memória e linfócitos T CD8+ *naïve*, transição e memória nos grupos ATG e PTCy pré-transplante e nos dias +30, +60, +90 e +180 pós-infusão

Entre os linfócitos T, em nenhum dos momentos avaliados (pré-transplante, D+30, D+60, D+90 e D+180) encontramos diferença entre os grupos com relação ao perfil de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. No pré-transplante havia predomínio de linfócitos T CD4⁺ de memória e CD8⁺ *naive* em ambos os grupos. No D+30, em ambos os grupos, houve predomínio de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória. No D+60 e +90 em ambos os grupos, observamos persistência de predomínio de linfócitos T CD4⁺ de memória, porém com aumento de linfócitos T CD8⁺ *naive* e transição comparado ao D+30, enquanto no D+180 já observamos predomínio de linfócitos T CD8⁺ *naive* em ambos os grupos, ainda com baixas contagens de linfócitos T CD4⁺ *naive* e transição, comparados aos linfócitos T CD4⁺ de memória (Figuras 16 e 17).



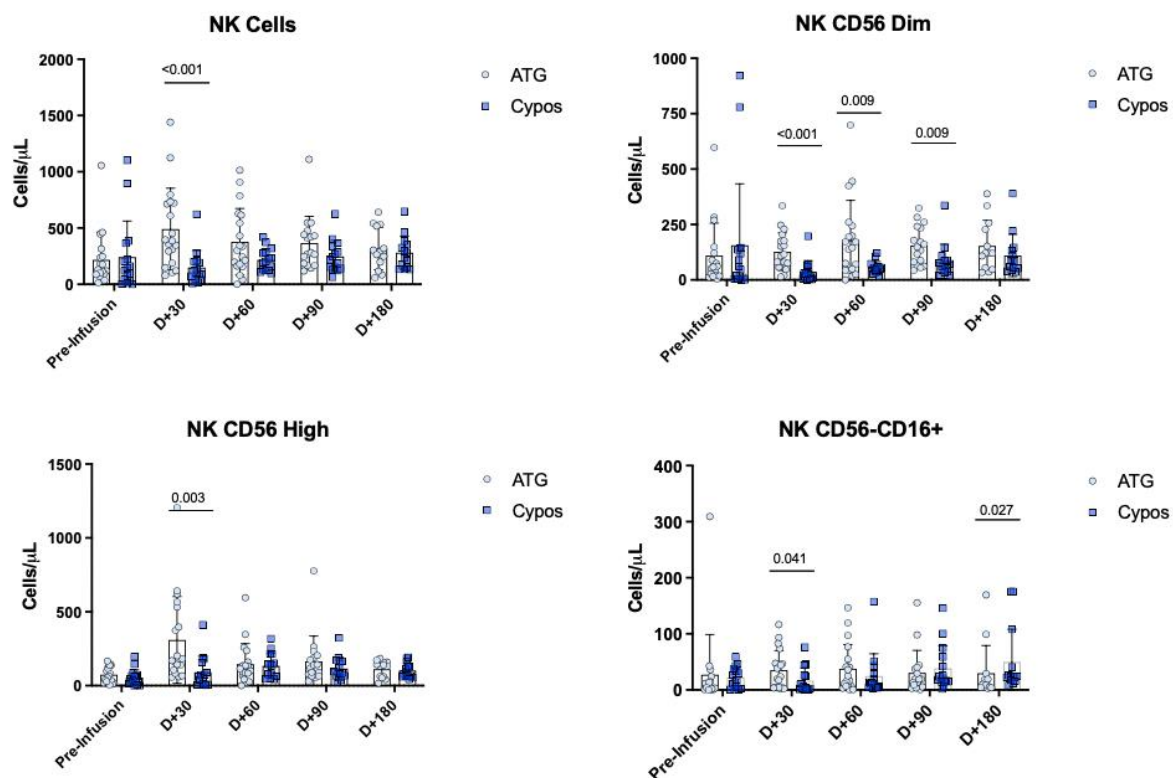
Agregados de células obtidos através da plataforma Cytobank demonstra predomínio de linfócitos T CD8⁺ nas fases precoces até D+180, com predomínio de células CD4⁺ com características de memória (CD45RO⁺) e CD8⁺ memória, mas com maior número de transição e *naive* (CD45RA⁺).

Figura 17. Grupos de células da plataforma Cytobank mostrando diferenças entre 2 pacientes, um que recebeu globulina antitimocítica (ATG) e outro que recebeu ciclofosfamida pós-transplante, em relação aos marcadores de células T nos dias +30, +60, +90

Foi realizada também análise de subtipos de linfócitos NK conforme expressão de CD56^{hi} ou CD56^{dim} e expressão de CD16 (Tabela 8). Não houve diferença entre os grupos com relação ao perfil de células NK pré-transplante. No D+30, no Grupo ATG, quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida, houve maior número de células NK CD56^{dim} (108 *versus* 25cels/ μ L, $p < 0,001$), CD56^{high} (177 *versus* 62cels/ μ L, $p = 0,003$) e CD56^{neg}, CD16^{pos} e NKG2D^{pos} (24 *versus* 3cels/ μ L, $p = 0,041$). No D+60 e no D+90, no Grupo ATG, houve maior número de células CD56^{dim} quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida (158 *versus* 50cels/ μ L, $p = 0,009$ e 148 *versus* 68cels/ μ L, $p = 0,009$). No D+180, não houve diferença entre os grupos com relação a linfócitos NK CD56^{dim} ou CD56^{high}, porém, no Grupo Ciclofosfamida, houve maior número de células CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos} (10 *versus* 24cels/ μ L, $p = 0,027$), representado na figura 18.

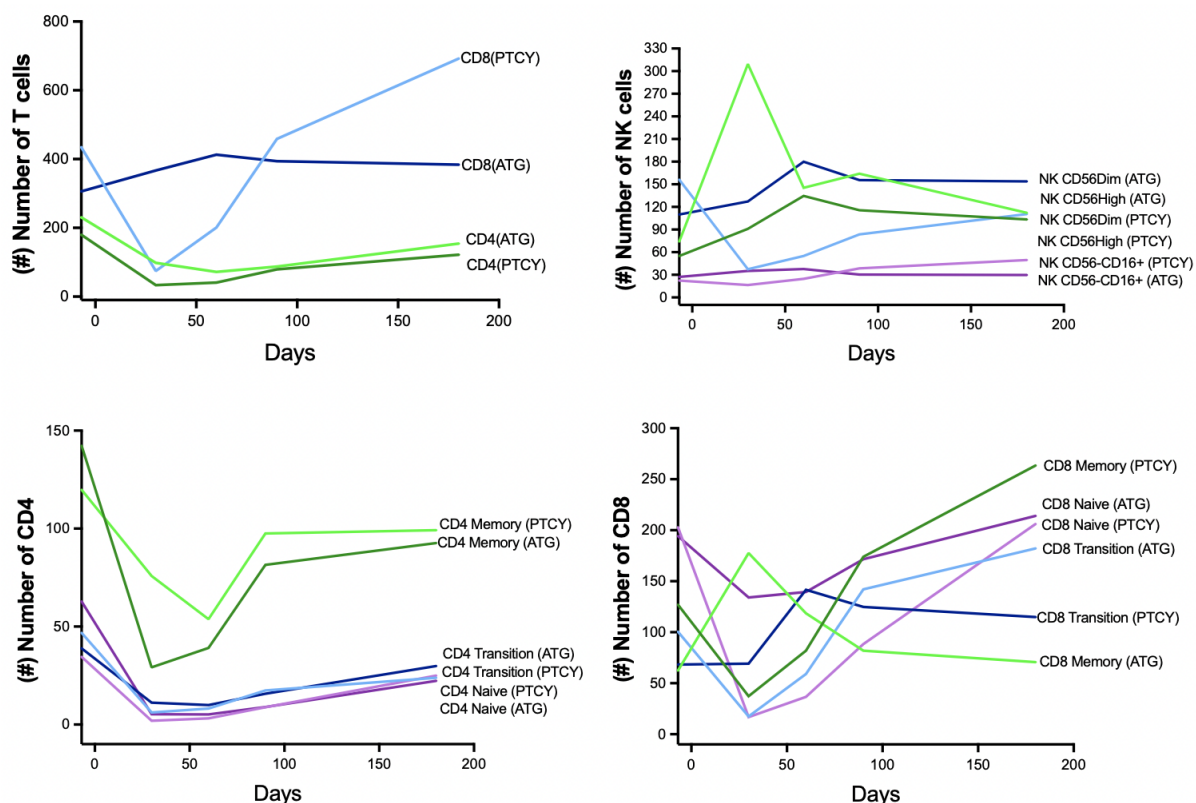
Tabela 8. Subtipos de células NK pós-transplante

Dia		ATG	Ciclofosfamida	Valor-p
		Células/ μ L mediana [DP]	Células/ μ L mediana [DP]	
Pré	CD56 ^{dim}	58[29-105]	60 [14-139]	0,890
	CD56 ^{hi}	65 [33-126]	44 [24-70]	0,367
	CD56-CD16+NKG2D ⁺	7[2-14]	27[8-36]	0,061
D+30	CD56 ^{dim}	108[72-176]	25[9-48]	<0,001
	CD56 ^{hi}	177[123-464]	62[10-121]	0,003
	CD56-CD16+NKG2D ⁺	24[4-47]	3[2-23]	0,041
D+60	CD56 ^{dim}	158[55-232]	50[39-59]	0,009
	CD56 ^{hi}	116[86-155]	136[67-183]	0,986
	CD56-CD16+NKG2D ⁺	21[8-51]	10[4-24]	0,164
D+90	CD56 ^{dim}	148[81-234]	68[41-88]	0,009
	CD56 ^{hi}	119[76-188]	90[68-164]	0,450
	CD56-CD16+NKG2D ⁺	19[9-37]	21[15-50]	0,326
D+180	CD56 ^{dim}	120[55-228]	87[52-127]	0,320
	CD56 ^{hi}	133[63-157]	89[64-131]	0,790
	CD56-CD16+NKG2D ⁺	10[4-19]	24[19-37]	0,027



Células NK e subtipos de células NK ($CD56^{high}$, $CD56^{dim}$ ou $CD56^{-}$, $CD16^{+}$, $NKG2D^{+}$) pré-transplante e nos dias +30, +60, +90 e +180 pós-transplante nos grupos ATG e PTCy, com maior número de células NK totais e $CD56^{dim}$, $CD56^{High}$ e $CD56-CD16^{+}$ no Grupo ATG no D+30, maior número de células $CD56^{dim}$ no Grupo ATG no D+60 e D+90 e maior número de células $CD56-CD16^{+}$ no grupo PTCy no D+180.

Figura 18. Subtipos de células NK pós-transplante



Células T CD4+ e CD8+ pós-transplante, inversão da relação CD4/CD8 em ambos os grupos. Células T CD4+ representadas principalmente por células CD4+ de memória em ambos os grupos, enquanto há recuperação mais precoce de células CD8+ de transição e *naive*, em ambos os grupos. Com relação aos subtipos de células NK, há aumento precoce de células CD56High no Grupo ATG, o que não acontece do grupo PTCy, o qual apresenta reconstituição de células NK mais tardia.

Figura 19. Subtipos de células T e NK pós-transplante

3.4 Análise de resposta citomegalovírus-específica

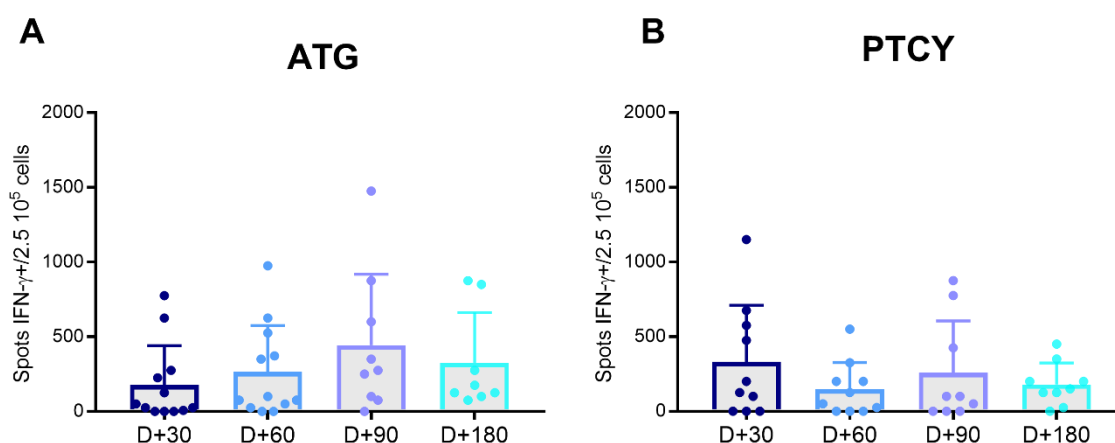
Trinta e quatro casos foram avaliados com relação a recuperação imune CMV-específica (2 pacientes com óbito precoce não foram avaliados). Cinco pacientes foram excluídos dessa análise por resultados de ELISpot sem possibilidade de leitura, além disso, pacientes em que havia menor de 75.000 células por *spot* também foram excluídos, por contagem de células insuficiente, ficando 12 pacientes analisados no Grupo ATG e 9 pacientes no Grupo Ciclofosfamida. Os resultados estão representados na figura 20.

Pré-transplante, a mediana de *spots* por 250.000 células foi de 187,5 (20-450) no Grupo ATG e 175 por 250.000 células (50-550) no Grupo Ciclofosfamida ($p=0,859$). No D+30, a mediana foi de 37,5 por 250.000 células (5,6-237,5) no Grupo ATG e 162,5 por 250.000 células (25-550) no Grupo Ciclofosfamida ($p=0,527$). No D+60, a mediana foi de 87,5 por 250.000 células (43,8-412,5) no Grupo ATG e 87,5 por 250.000

células (6,2-200) no Grupo Ciclofosfamida ($p=0,407$). No D+90, a mediana foi de 275 por 250.000 células (100-600) no Grupo ATG e 100 por 250.000 células (6,2-200) ($p=0,286$) no Grupo Ciclofosfamida e no D+180 foi de 125 por 250.000 células (81,2-250) no Grupo ATG e 150 por 250.000 células (125-200) ($p=0,774$) no Grupo Ciclofosfamida (Tabela 9).

Tabela 9. Resposta citomegalovírus-específica

Variável	ATG	Ciclofosfamida	Valor-p
	Spots/250.000cels	Spots/250.000cels	
Pré	187.5	175	0,859
D+30	37.5	162.5	0,527
D+60	87.5	87.5	0,407
D+90	275	100	0,286
D+180	125	150	0,774



(A) Resposta ao CMV após TMO em pacientes que utilizaram ATG nos dias +30, +60, +90 e +180 pós-transplante; (B) Resposta ao CMV após TMO em pacientes que utilizaram ciclofosfamida nos dias +30, +60, +90 e +180 pós-transplante.

Figura 20. Resposta ao citomegalovírus

3.5 Desfechos secundários

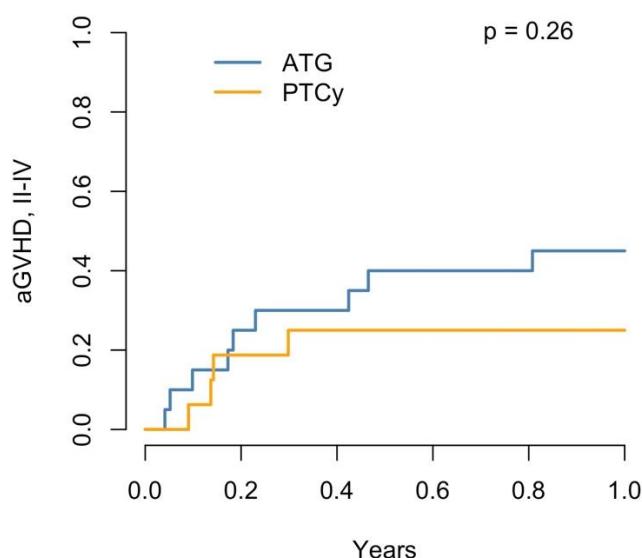
3.5.1 Resultados clínicos do transplante

Com relação aos resultados do transplante, 19/20 (95%) dos pacientes no Grupo ATG apresentaram enxertia neutrofílica, em mediana de 12 dias, enquanto no Grupo Ciclofosfamida, todos os pacientes apresentaram enxertia, com mediana de 16 dias ($p=0,0001$). Com relação a enxertia plaquetária, 18/20 (90%) dos pacientes no Grupo ATG apresentaram enxertia, em mediana de 14 dias e 15/16 (93,75%) do Grupo Ciclofosfamida, com mediana de 23 dias.

Com relação ao tempo da internação do transplante, a mediana no Grupo ATG foi de 33 dias e no Grupo Ciclofosfamida foi de 33,5 dias ($p=0,26$). No Grupo ATG 14/20 (70%) dos casos apresentaram mucosite graus III ou IV, 1 (5%) apresentou microangiopatia trombótica (MAT), 1 (5%), SLC grau I após infusão e 1 (5%) síndrome de obstrução sinusoidal grave, enquanto no Grupo Ciclofosfamida, 12/16 (75%) apresentaram mucosite graus III e IV, 3/16 (18,75%) SLC grau I, 1 (6,25%) síndrome de obstrução sinusoidal e 1 (6,25%) MAT.

3.5.2 Doença do enxerto contra hospedeiro

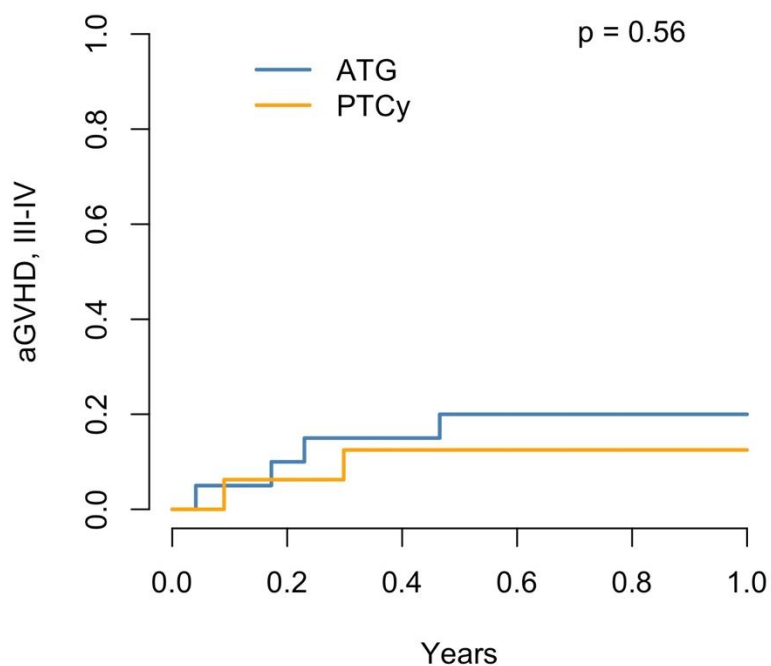
Em 180 dias pós-transplante, entre os pacientes do Grupo ATG 40% apresentaram DECH agudo graus II a IV em mediana de 64 dias pós-transplante comparado a 25%, com mediana de 51 dias pós-transplante do Grupo Ciclofosfamida ($p=0,26$) (Figura 21). Ausência de significância estatística pode ser explicada pelo número de casos, com aumento de casos, o resultado pode ser significativo.



DECH agudo graus II a IV em pacientes que utilizaram ATG (linha azul) ou ciclofosfamida (linha laranja).

Figura 21. Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda graus II a IV

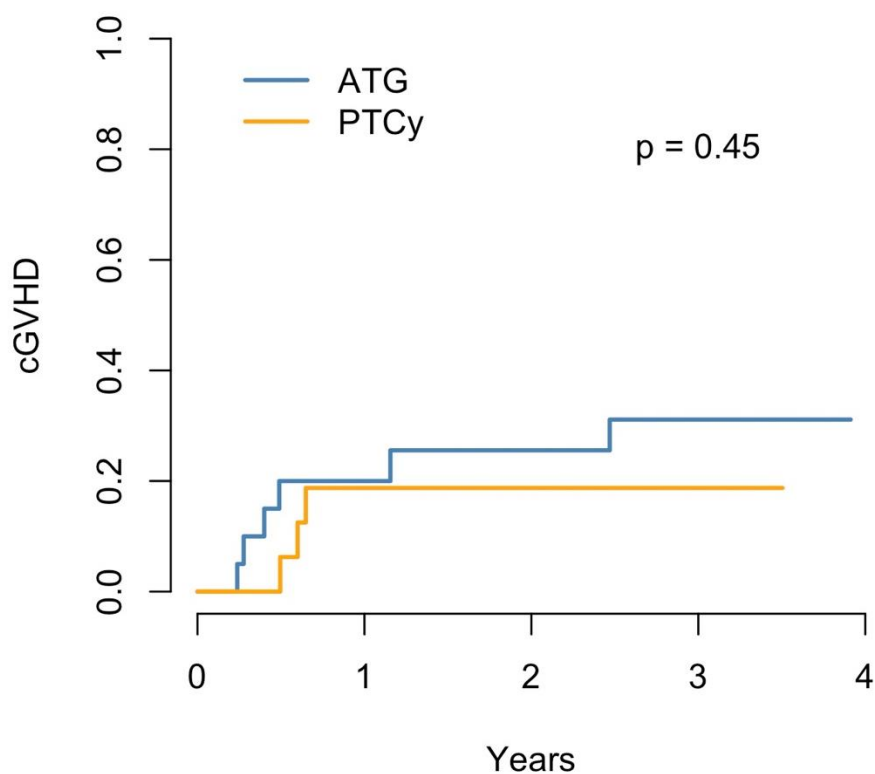
Com relação a DECH aguda graus III e IV, em 180 dias pós-transplante 20% dos pacientes do Grupo ATG e 13% dos pacientes do Grupo Ciclofosfamida apresentaram essa complicação ($p=0,56$) (Figura 22).



DECH aguda graus III e IV em pacientes que utilizaram ATG (linha azul) ou ciclofosfamida (linha laranja).

Figura 22. Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda graus III a IV

Com relação a DECH crônica, em 3 anos, ocorreu em 31% do Grupo ATG, sendo 4 pacientes com DECH extenso, incluindo envolvimento pulmonar e hepático, já no Grupo Ciclofosfamida, 19% dos pacientes apresentou DECH crônica ($p=0,19$) (Figura 23).

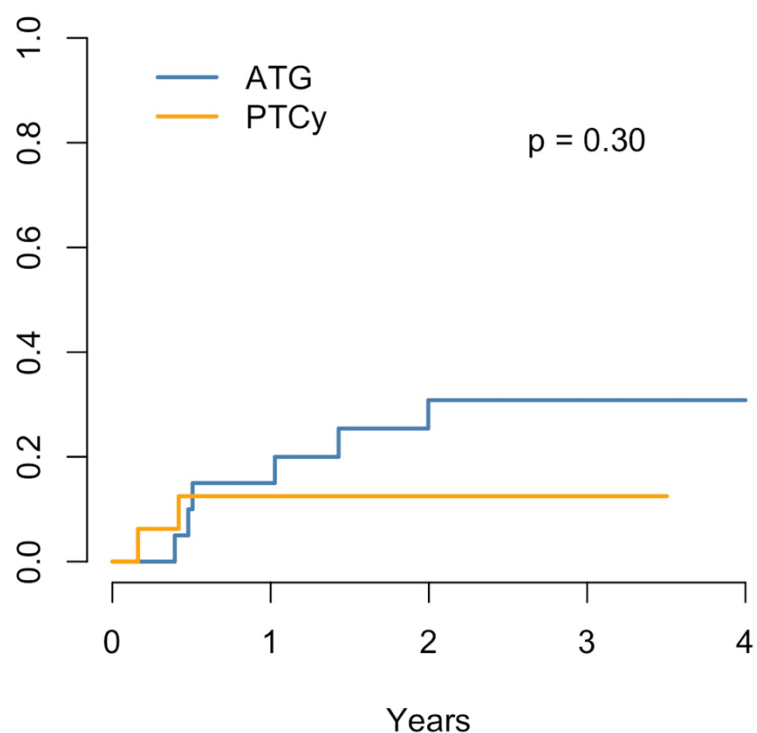


DECH crônica em pacientes que utilizaram ATG (linha azul) ou ciclofosfamida (linha laranja).

Figura 23. Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica

3.5.3 Mortalidade não relacionada a recaída

Com relação aos desfechos de sobrevida, no Grupo ATG, 4 pacientes apresentaram mortalidade relacionada ao transplante, sendo 1 paciente por insuficiência respiratória secundária a quadro infeccioso, 1 paciente por choque séptico antes da enxertia neutrofílica e 2 casos de óbito secundário a infecção por COVID-19 (31% em 3 anos), enquanto no Grupo Ciclofosfamida, houve 2 mortes relacionadas ao transplante (1 por choque séptico secundário a falha de enxertia secundária e 1 por DECH aguda de trato gastrointestinal) (13% em 3 anos) ($p=0,30$) (Figura 24).

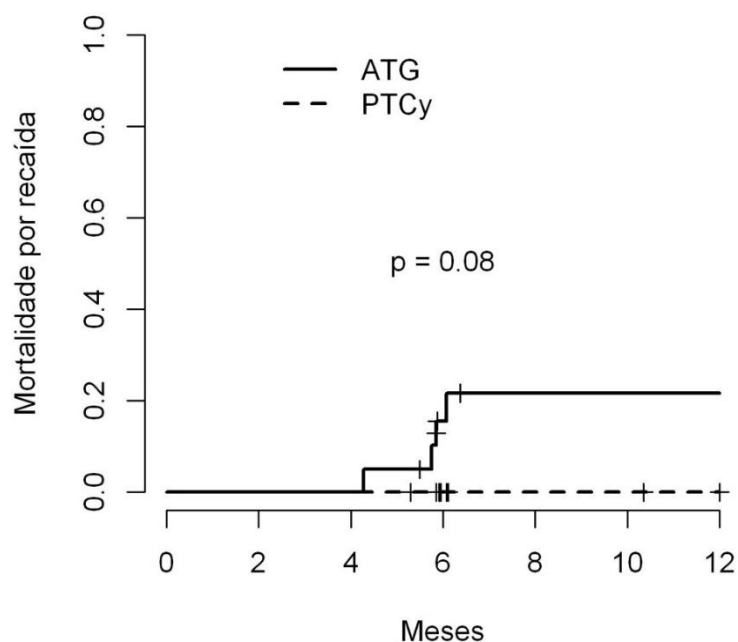


Mortalidade relacionada ao transplante em pacientes que utilizaram ATG (linha azul) ou ciclofosfamida (linha laranja).

Figura 24. Mortalidade relacionada ao transplante

3.5.4 Mortalidade relacionada a recaída

No período analisado, no Grupo ATG, houve 5 mortes relacionadas a recaída da doença de base (25%), enquanto, no Grupo Ciclofosfamida, houve 2 mortes relacionadas a recaída (12,5%) (Figura 25).

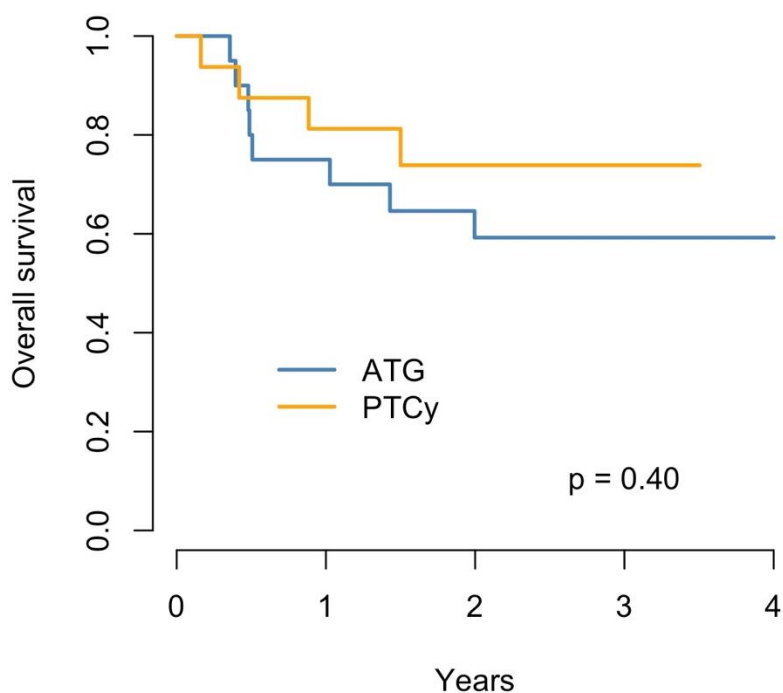


Mortalidade relacionada a recidiva em pacientes que utilizaram ATG (linha contínua) ou ciclofosfamida (linha tracejada).

Figura 25. Mortalidade relacionada a recaída

3.5.5 Sobrevida global

Com relação a sobrevida global, não houve diferença entre o grupo que recebeu ciclofosfamida ou ATG, sendo de 59% no Grupo ATG e 74% no Grupo Ciclofosfamida, no período analisado (*follow-up* mediano de 3,25 anos) ($p=0,4$) (Figura 26).



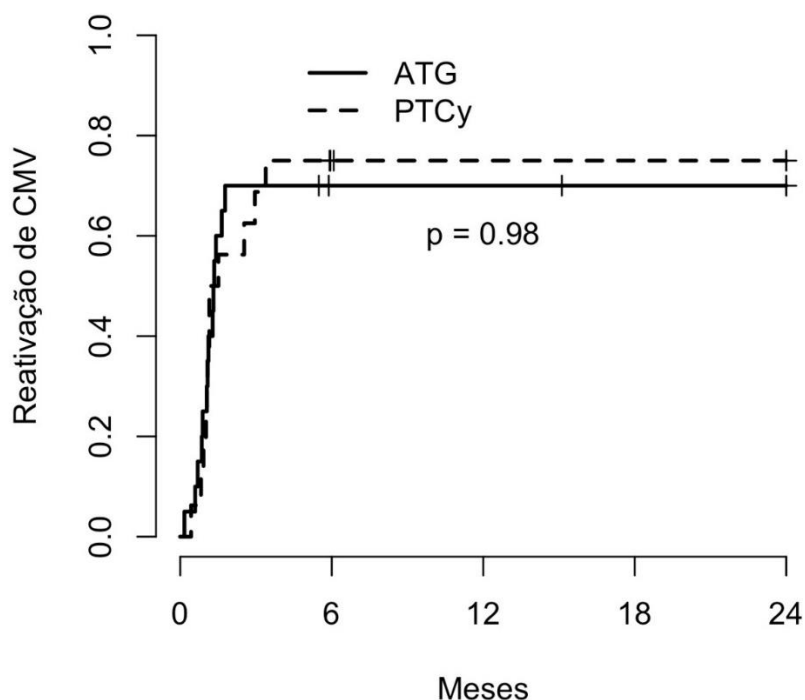
Sobrevida global em pacientes que utilizaram ATG (linha azul) ou ciclofosfamida (linha laranja).

Figura 26. Sobrevida global

3.5.6 Reativação viral

3.5.6.1 Citomegalovírus

A reativação viral mais frequente foi o CMV, que ocorreu em 70% do Grupo ATG, em mediana de 33,5 dias e 75% do Grupo Ciclofosfamida ($p=0,98$), em mediana de 34 dias para primeira reativação (Figura 27), em 180 dias pós-transplante.



Reativação de CMV em pacientes que utilizaram ATG (linha contínua) ou ciclofosfamida (linha tracejada).

Figura 27. Reativação de citomegalovírus

Não houve diferença entre os grupos com relação a carga viral máxima de CMV durante a reativação, que foi mediana de 959UI/mL no Grupo ATG e 932UI/mL no Grupo da Ciclofosfamida ($p=0,81$).

Foi realizada avaliação de sobrevida global e reativação de CMV como covariável tempo dependente, sendo que, na presente população, reativação de CMV não teve impacto em sobrevida global HR 1,17 (0,24-5,82) ($p=0,85$).

Segunda reativação de CMV ocorreu em 4/20 pacientes do Grupo ATG (20%), em mediana de 106 dias pós-transplante, com mediana de carga viral máxima de 858UI/mL e em 1/16 (6%) do Grupo Ciclofosfamida, em 123 dias pós-transplante, com carga máxima de 200UI/mL. Nenhum paciente do Grupo ATG apresentou doença causada pelo CMV, enquanto 3 pacientes do Grupo Ciclofosfamida apresentaram (cistite, acometimento pulmonar e medular).

3.5.6.2 Reativação de outros vírus

Com relação a outras reativações virais, no Grupo ATG, a segunda reativação mais frequente foi o EBV, que ocorreu em 7/20 (35%), em mediana de 60 dias

pós-transplante, porém apenas 1 paciente apresentou necessidade de tratamento, que foi realizado com rituximabe, os demais pacientes apresentaram carga viral baixa, sem necessidade de tratamento específico. Com relação a cistite hemorrágica por BK vírus, essa ocorreu em apenas 1/20 paciente (5%) em 31 dias pós-transplante, 2 pacientes (10%) apresentaram infecção por adenovírus, sendo que 1 deles apresentou cistite e viremia em 48 dias pós-transplante e o outro apresentou viremia, cistite e acometimento pulmonar, com 21 dias pós-transplante.

Já no Grupo Ciclofosfamida, 3/16 (18,7%) dos pacientes apresentaram cistite hemorrágica por BK vírus, que ocorreu em mediana de 36 dias pós-transplante, 1 paciente apresentou viremia por adenovírus, que ocorreu 47 dias pós-transplante e nenhum paciente apresentou viremia relacionada ao EBV.

3.5.7 Análise de desfechos clínicos com relação a reconstituição imune

Foram avaliados possíveis fatores de risco e proteção entre dados clínicos e dados de reconstituição imune para os desfechos clínicos de sobrevida global, reativação de CMV até D+100, DECH aguda graus II-IV e III-IV até D+100 e d DECH crônica.

Com relação a sobrevida global, nos fatores pré-transplante avaliados, *performance status* avaliado por Karnofsky de 90 ou 100 foi fator protetor para maior sobrevida (HR 0,3 IC 95% 0,1-0,96, $p=0,042$). No D+30, maior número absoluto de CD4⁺ de transição foi relacionado a pior sobrevida (HR 1,01 IC 95% 1,01-1,04 $p=0,0083$).

Com relação a DECH aguda graus II-IV, no D+60, a contagem de células CD4⁺ *naïve* (HR 1,04 IC 95% 1-1,09 $p=0,047$), CD4⁺ de transição (HR 1,04 IC 95% 1,01-1,07 $p=0,012$) e CD8⁺ *naïve* (HR 1 IC 95% 1-1,01 $p=0,026$) foram fatores de risco.

Com relação à DECH hospedeiro crônica, no D+180 pós-transplante, maior quantidade de células CD4⁺ de memória (HR 1,01 IC 95% 1-1,02 $p=0,014$) foi fator de risco.

Não foram encontrados fatores de risco e proteção com relação aos dados de reconstituição imune no D+30, D+60 e D+90 para reativação de CMV.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, em uma população em que todos os pacientes apresentavam diagnóstico onco-hematológico e todos foram submetidos a transplante alogênico com doador não aparentado, foram comparadas, prospectivamente, 2 formas diferentes de imunossupressão pós-transplante (ATG ou ciclofosfamida pós-transplante) com relação a reconstituição imune pós-transplante e desfechos clínicos do transplante.

Quando comparados os 2 tipos de tratamento, alguns fatores relevantes com relação à reconstituição imune foram encontrados: precocemente pós-transplante, no D+30, no Grupo ATG, quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida, houve maior número de linfócitos T, B e NK, além de células NK CD56^{high}, CD56^{dim} e CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos}. Porém, no D+180, ocorreu uma inversão, com maior número no Grupo Ciclofosfamida. No D+60 e no D+90, no Grupo ATG, houve maior número de células CD56^{dim} quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida, já no D+180, não houve diferença entre os grupos com relação a linfócitos NK CD56^{dim} ou CD56^{high}, porém, no Grupo Ciclofosfamida, houve maior número de células CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos}. Além disso, encontramos uma população de linfócitos T duplo positivos CD4 e CD8, com predomínio no Grupo Ciclofosfamida no D+180. Em ambos os grupos, os linfócitos T CD4⁺, em todos os momentos avaliados, eram predominantemente células de memória, enquanto os linfócitos T CD8⁺ eram predominantemente de memória no D+30 e D+60. No D+90, entre os linfócitos T CD8⁺, houve predomínio de linfócitos de transição, enquanto no D+180 já observamos predomínio de linfócitos T CD8⁺ *naïve* em ambos os grupos.

Rambaldi et al.⁽⁷⁵⁾ avaliaram reconstituição imune em pacientes submetidos a transplante haploidêntico com ciclofosfamida pós-transplante ou transplante compatível com profilaxia clássica e descreveu reconstituição mais tardia de linfócitos T, com redução expressiva de linfócitos T *naïve* e atrasada e redução de células NK, além disso, esse autor encontrou no transplante haploidêntico, expansão preferencial de células NK imaturas CD56^{bright}CD16 quando comparado a profilaxia clássica de imunossupressão.

Linfócitos NK CD56^{hi}, predominantes nos órgãos linfoides secundários, derivam principalmente de célula progenitora hematopoiética CD34 e, aparentemente, dão origem aos linfócitos CD56^{dim}, visto que usualmente aparecem

antes dos linfócitos CD56^{dim} pós-transplante de medula óssea. Células NK CD56^{hi} são as principais produtoras de citocinas, enquanto CD56^{dim} são responsáveis por atividade citolítica e morte de células alvo, com rápida indução de respostas inflamatórias, recrutamento de outras células de defesa e moldagem de resposta imune adaptativa.⁽¹⁰³⁾ Em indivíduos saudáveis, as células NK CD56^{hi} são adaptadas para produzir citocinas, particularmente interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), enquanto as células NK CD56^{dim} são enriquecidas para perforina e granzimas e, portanto, adaptadas para citotoxicidade.⁽¹⁰⁴⁾

No contexto de transplante alogênico, as células NK são a primeira população de linfócitos derivados de doadores a se reconstituir numericamente. Os números normais de células NK são geralmente observados no primeiro mês após o transplante, independentemente da fonte do enxerto.⁽¹⁰⁵⁾

Acredita-se que células NK em reconstituição são derivadas principalmente da diferenciação e maturação de células progenitoras, ao invés da expansão de células NK maduras dentro do enxerto, visto que a reconstituição de células NK é amplamente independente do tipo de enxerto e seu conteúdo de células NK⁽¹⁰⁶⁾ e as células NK de reconstituição precoce têm um fenótipo CD56^{bright} imaturo, representando 40-50% das células NK nos primeiros meses, enquanto representam cerca de 5-10% nos adultos sadios e só adquirem o fenótipo NK predominantemente CD56^{dim} após vários meses,⁽¹⁰⁷⁾ porém, a expansão *in vivo* de células NK transferidas do doador também pode contribuir, visto que um estudo que comparou reconstituição NK entre transplante haploidêntico com depleção CD3/CD19⁺ e seleção positiva de CD34, encontrou melhor reconstituição NK na primeira situação, a qual continha no enxerto 3 *logs* a mais de NK maduras.⁽¹⁰⁸⁾ No contexto de transplante haploidêntico com seleção positiva de CD34, sem imunossupressão adicional pós-transplante, um estudo que avaliou 10 casos demonstrou que as células NK apresentavam fenótipo imaturo, sendo que a subpopulação CD3-CD56^{dim} era pequena e disfuncional, com potencial impacto nos desfechos do transplante.⁽¹⁰⁹⁾ No presente estudo, encontramos população com menor número de células NK CD56^{dim} no Grupo Ciclofosfamida, quando comparado ao Grupo ATG, até D+90 pós-transplante.

Estudo prospectivo que avaliou 439 pacientes adultos submetidos a transplante alogênico encontrou, em análise multivariada, que contagem de células NK CD56^{high} em 3 meses pós-transplante estava significativamente mais elevada quando utilizado condicionamento mieloablativo do que no regime de intensidade reduzida. Além

disso, maior contagem de células NK se relacionou a menor risco de DECH crônica.⁽¹¹⁰⁾

Após o TCTH alogênico, entretanto, há uma dissociação entre a recuperação da produção de citocinas e a função citotóxica.⁽¹¹¹⁾ Apesar da alta proporção de células NK CD56^{bright} nos primeiros 6 meses após o transplante, a produção de IFN- γ é mais prejudicada do que a degranulação de células NK e citotoxicidade.⁽¹¹¹⁾ Em um estudo comparando o transplante HLA-compatível repleto em células T com imunossupressão *versus* transplante haploidêntico depletado em células T sem imunossupressão, a secreção e a degranulação de IFN- γ foi reduzido no transplante depletado em células T.⁽¹¹¹⁾ Outro estudo, não aparentado, em que função de células NK foi avaliada no dia 100 pós-transplante com medula óssea não manipulada ou depletada em células T, as células NK expressaram menos KIRs e produziram mais IFN- γ após transplante não manipulado.⁽¹¹²⁾

Da mesma forma, em um estudo comparando transplante parcialmente depletado em células T *versus* transplante extensamente depletado em células T, ambos sem imunossupressores pós-transplante, as células NK reconstituídas no grupo com depleção extensa de células T apresentaram proporções mais altas de células NK CD56^{hi} e NKG2A⁺ imaturas e citotoxicidade diminuída.^(107,109) Entretanto, é difícil diferenciar a ação da imunossupressão pós-transplante de outros fatores que podem influenciar a reconstituição de células NK, a ciclosporina, por exemplo, parece suprimir proliferação NK *in vitro*, especialmente CD56^{dim}, levando a aumento relativo de CD56^{hi}.⁽¹¹³⁾

Além disso, outro estudo avaliou, em 58 pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea, a reconstituição de células NK e sua produção citotóxica no controle da infecção por CMV e encontrou que o grupo com doença por CMV apresentava atraso na recuperação de células NK CD56^{dim}, além de redução na função NK, quando comparado ao grupo com reativação de CMV, mas sem doença, sugerindo que maturação NK contribui para proteção contra CMV.⁽¹¹⁴⁾

No presente estudo, identificamos população de células NK CD45^{pos}, CD3^{neg}, CD11b^{neg}, CD14^{neg}, CD19^{neg}, CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos}. As células NK humanas são geralmente definidas como linfócitos CD3⁻CD56⁺. No entanto, uma população de linfócitos CD56⁻CD16⁺ (CD56^{neg}) que exibe associação com marcadores NK se expande durante infecções virais crônicas, como HIV-1 e HCV, e em infecções por herpesvirus. Muitas questões permanecem sobre a origem, desenvolvimento, fenótipo e função da população de células NK CD56^{neg}. Uma metanálise que avaliou 757

indivíduos, de um total de 28 estudos encontrou que essas células CD56^{neg} constitui 5,67% das células NK em sangue periférico saudável, enquanto a infecção pelo HIV-1 aumenta essa população para 10,69%, sem evidência de exaustão aumentada ou proliferação diminuída dentro do subgrupo CD56^{neg}.⁽¹¹⁵⁾

Com relação aos subtipos de linfócitos T, foi evidenciado aumento de linfócitos T CD8⁺, com inversão da relação CD4/CD8. Os linfócitos T CD4⁺, em todos os momentos avaliados e CD8⁺, no D+30, eram representados, fenotipicamente, em sua maioria, por linfócitos de memória, conforme descrito previamente em pacientes que receberam imunossupressão com ciclofosfamida pós-transplante,⁽⁷³⁾ enquanto observamos, nos 2 grupos, aumento de linfócitos T CD8⁺ *naïve* e transição a partir do D+60, sendo que no D+180 foi observado predomínio de linfócitos T CD8⁺ *naïve* em ambos os grupos, ainda com baixas contagens de linfócitos T CD4⁺ *naïve* e transição, comparados aos linfócitos T CD4⁺ de memória, demonstrando a reconstituição lenta de linfócitos T CD4⁺.^(52,53) Kanakry et al. também descreveram que a reconstituição de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ foi primariamente de células efectoras de memória (CD45RA⁻CCR7⁻) e com diferenciação terminal (CD45RA⁺CCR7⁻) em pacientes submetidos a transplante com ciclofosfamida pós-transplante.⁽⁷³⁾ Sabe-se que a primeira “onda” de linfócitos T após transplante compreende células T do doador que se submete a proliferação induzida por linfopenia e aloativação, resultando em células T policlonais com repertório de receptores T restrito e limitada especificidade antigênica ou com alorreatividade, causando DECH. A reconstituição completa de linfócitos T, com diversidade de TCR, requer regeneração tímica e desenvolvimento endógeno de linfócitos T, tornando essa reconstituição lenta.⁽⁵⁷⁾

Entre os linfócitos T, no Grupo Ciclofosfamida, encontramos maior porcentagem de linfócitos T duplo positivos TCD4⁺CD8⁺ no D+180, proporções maiores do que aquelas encontradas no transplante com ATG, o que pode estar relacionado com desenvolvimento de linfócitos T pós-transplante. O desenvolvimento de células T se inicia de progenitores de células T, os quais se originam de progenitores linfoides da medula óssea, migram para o timo e progridem através de passos bem caracterizados. Timócitos vão de estágios CD4 e CD8 duplo negativos e duplo positivos para formas CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺.⁽⁵⁷⁾

Alhaj Hussen et al.⁽¹¹⁶⁾ observaram o desenvolvimento de linfócitos T duplo positivo durante DECH xenogênico e que essa população é proveniente de células T CD8, com fenótipo regulador caracterizada por altos níveis de IL-10 e IL-13, baixos

níveis de IFN- γ e alta expressão de PD-1, porém não encontraram associação desses linfócitos com receptores de transplante alogênico com DECH ativa quando biópsias de sangue, duodeno ou retal foram analisados.

Hess et al.⁽¹¹⁷⁾ identificaram, em um estudo observacional com 35 pacientes, todos submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclofosfamida pós-transplante, cinco biomarcadores preditivos de DECH, incluindo população de CD4/CD8 duplo positivo. Em um modelo xenogênico, os autores identificaram essa população como transcricionalmente, metabolicamente e funcionalmente distintos de células T positivas simples CD4 e CD8, demonstrando ser células T CD8 cronicamente ativadas, altamente inflamatórias, secretando IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-17A, IL-22, granzima e perforina, que ganham as funções efetoras da linhagem CD4, estando diretamente implicada na patogênese da DECH e ao diagnóstico futuro de DECH. Como todos os pacientes desse estudo receberam ciclofosfamida pós-transplante, é incerto se o valor preditivo de DECH valeria também ao protocolo clássico de imunossupressão, mas em nosso trabalho, esses linfócitos foram mais frequentes na população duplo positiva.

Com relação à análise de resposta CMV-específica, não foi encontrada diferença com significância estatística entre os grupos avaliados, assim como não foi encontrada diferença de reativação de CMV entre os 2 grupos de tratamento. No D+60, em ambos os grupos de tratamento, o número de “spots” identificados na placa de ELISpot/ 250.000 células estava abaixo de 100 spots (mediana de 87,5 spots em ambos os grupos). Estudo publicado por Nesher et al.,⁽⁹⁵⁾ avaliou prospectivamente 63 pacientes CMV positivos submetidos a transplante alogênico de medula óssea e identificou corte de 100 spots por 250.000 células como fator de proteção à infecção por CMV, na ausência de DECH ou uso de corticoide sistêmico, sendo que essa resposta no ELISpot foi o único fator protetor em análise multivariada do estudo, demonstrando o maior risco de infecção por CMV em ambos os grupos estudados no presente estudo, nessa fase de transplante.

Com relação aos desfechos clínicos, foi observado que, com ambas as formas de imunossupressão houve altas taxas de enxertia neutrofílica (95% do Grupo ATG e 100% do Grupo Ciclofosfamida), porém a enxertia neutrofílica foi mais precoce com ATG (mediana de 12 dias), comparado à ciclofosfamida (mediana de 16 dias), com diferença estatisticamente significativa, o que pode ser explicado pela utilização de quimioterapia pós-infusão de células hematopoiéticas progenitoras. Atraso na enxertia em pacientes submetidos a imunossupressão com uso de ciclofosfamida pós-

transplante, quando comparado a outros tipos de imunossupressão, já foi descrito em outros estudos,^(118,119) como o estudo de Mehta et al., que comparou o uso de ciclofosfamida ou profilaxia tradicional em pacientes submetidos a transplante com doador não aparentado e o tempo mediana para enxertia neutrofílica foi maior com ciclofosfamida (18 *versus* 12 dias) ($p < 0,001$) e plaquetária de 25 *versus* 18 dias ($p = 0,05$).⁽²⁵⁾

Com relação às toxicidades precoces pós-transplante, ambos os grupos apresentaram toxicidades semelhantes, com altas taxas de mucosite graus III e IV (70% no Grupo ATG e 75% no Grupo Ciclofosfamida). A SLC ocorreu em 1 caso do Grupo ATG e 3 casos (18,75%) do Grupo Ciclofosfamida, todos com grau I. Essa incidência foi menor do que a encontrada com a utilização de ciclofosfamida pós-transplante no contexto de transplante haploidêntico, em que febre de origem não-infecciosa ocorre em cerca de 80-90% dos casos, geralmente entre os dias 0 e 6. Essa febre está relacionada com *mismatch* no HLA classe II e altas doses de linfócitos CD3⁺ no produto infundido. A SLC graus III e IV pode estar relacionada com aumento de mortalidade relacionada ao transplante.⁽⁷⁹⁾ Outro estudo que comparou uso de ATG e ciclofosfamida no contexto de transplante não aparentado com *mismatch*, encontrou que SLC ocorreu em 36% dos casos com uso de ciclofosfamida e 35% com ATG, sendo a maioria dos casos grau 1 ou 2 (100% com ciclofosfamida e 89% com ATG), sendo que 2 pacientes do Grupo Ciclofosfamida receberam tocilizumabe como tratamento.⁽¹¹⁹⁾

A MAT associada ao transplante é uma complicação vascular sistêmica associada a elevada morbimortalidade, resultante da convergência de diversos fatores de risco, com critérios diagnósticos que incluem aumento de desidrogenase láctica (DHL), redução de haptoglobina e presença de esquizócitos em sangue periférico. Em nosso estudo, apenas 1 paciente do Grupo Ciclofosfamida apresentou essa complicação, estando de acordo com dados da literatura, em que estudo retrospectivo com 678 pacientes que receberam ciclofosfamida pós-transplante como esquema de imunossupressão e a incidência cumulativa de MAT foi de 1,4%.⁽¹²⁰⁾ Outro estudo, retrospectivo, do CIBMTR, encontrou incidência cumulativa em 3 anos de MAT de 3% e identificou sexo feminino, transplante autólogo prévio, LLA ou anemia aplástica como diagnóstico de base, doador não aparentado ou com *mismatch*, regime de condicionamento mieloablativo, imunossupressão com *sirolimus* e inibidor de calcineurina, disfunção renal prévia e DECH aguda como fatores de risco.⁽¹²¹⁾

Com relação aos outros desfechos de transplante, no presente estudo, não foram encontradas diferenças de DECH aguda graus II a IV ou III a IV e DECH crônico, bem como em sobrevida global e mortalidade relacionada ao transplante e mortalidade relacionada a recaída. Estudos prévios que avaliaram a ciclofosfamida pós-transplante no contexto de transplante compatível encontraram menores incidências de DECH agudo graus II a IV.^(24,25)

Alguns estudos recentes compararam, no contexto de transplante não aparentado, a utilização de ciclofosfamida pós-transplante e ATG, assim como no presente estudo. Um estudo publicado por Nykolyszyn et al.⁽¹²²⁾ em 2020 comparou o uso de ciclofosfamida pós-transplante, realizado em 22 pacientes, com coorte histórica de ATG (40 pacientes) em pacientes submetidos a transplante não aparentado com *mismatch* e, comparado com ATG, o risco de DECH agudo II-IV foi menor com ciclofosfamida, sem diferença em DECH crônica, porém com benefício em mortalidade não relacionada a recaída a favor da ciclofosfamida.⁽¹²²⁾ Outro estudo, publicado por Battipaglia et al.⁽¹¹⁸⁾ também comparou, em pacientes com leucemia aguda, submetidos a transplante com doador não aparentado com *mismatch*, (9/10), o uso de ATG *versus* ciclofosfamida, utilizando dados de registro da plataforma EBMT. Foram incluídos 93 pacientes que receberam ciclofosfamida, que foram pareados com 179 que receberam ATG, com menor incidência de DECH aguda e maior sobrevida livre de leucemia e sobrevida livre de recaída e leucemia com uso de ciclofosfamida. Esse estudo apresentou algumas limitações, como a não avaliação de complicações infecciosas.⁽¹¹⁸⁾ Ainda nesse mesmo contexto, Modi et al.⁽¹¹⁹⁾ compararam, de forma retrospectiva, o uso de ciclofosfamida pós-transplante (50mg/Kg dias 3 e 4) com ATG (dose 4,5mg/Kg), ambos associados a MMF e *tacrolimus*, como profilaxia de DECH em 76 pacientes com LMA ou SMD que receberam transplante com doador não aparentado 7/8. Nesse grupo, 25 pacientes receberam ciclofosfamida e 51 ATG e não foi encontrada diferença com relação a sobrevida, recaída, sobrevida livre de recaída, sobrevida livre de DECH e recaída, porém, ATG foi relacionado a maior incidência de DECH aguda e crônica e mortalidade não relacionada a recaída.⁽¹¹⁹⁾

Com relação aos desfechos infecciosos, no presente estudo, reativação de CMV ocorreu em 70% do Grupo ATG e 75% do Grupo Ciclofosfamida ($p=0,98$), sem diferença entre os grupos. Houve 3 casos de doença por CMV no Grupo Ciclofosfamida e nenhuma no Grupo ATG. Com relação a outras reativações virais, no Grupo ATG, a segunda reativação mais frequente foi o EBV, que ocorreu em 7/20 (35%),

enquanto, no Grupo Ciclofosfamida, nenhum paciente apresentou essa complicação. Incidência semelhante de reativação de CMV com ATG no transplante não aparentado ou ciclofosfamida no transplante haploidêntico e maior incidência de reativação de EBV no contexto de uso de ATG já havia sido descrito previamente em trabalho publicado por nosso grupo em pacientes da população brasileira.⁽³⁶⁾ Os trabalhos que compararam ATG ou ciclofosfamida no contexto de transplante não aparentado com *mismatch* também não encontraram diferença com relação a reativação de CMV entre os grupos, sendo 57% com ATG e 55% com ciclofosfamida na publicação de Nykolyszyn et al.⁽¹²²⁾ e 20% com ciclofosfamida e 43% com ATG ($p=0,07$), com mediana de 39 dias com ciclofosfamida e 29 dias com ATG na publicação de Modi et al.⁽¹¹⁹⁾ Ambos os autores também encontraram maior incidência de EBV associado ao uso de ATG: 43 *versus* 9% na publicação de Nykolyszyn et al.⁽¹²²⁾ e 27 *versus* 8% na publicação de Modi et al.⁽¹¹⁹⁾ No contexto de infecções, outro estudo recente avaliou infecções bacterianas, virais e fúngicas em 117 pacientes que foram submetidos a transplante com ciclofosfamida pós-transplante sendo 34% haploidêntico, 19% aparentado, 47% não aparentado. A incidência, em 18 meses, de infecção bacteriana, viral e fúngica foi de 56, 69 e 8,7% respectivamente, sem diferença por tipo de doador, porém infecção por CMV e cistite hemorrágica por BK vírus ocorreu com maior frequência no Grupo Haploidêntico (58 *versus* 43% e 30 *versus* 8% no dia +90, $p<0,05$).⁽¹²³⁾

Com relação às correlações de desfechos clínicos com reconstituição imune, no D+30, maior número absoluto de CD4⁺ de transição foi relacionado a pior sobrevida e maior quantidade de células CD4⁺ *naive*, CD4⁺ de transição e CD8⁺ *naive* no D+60 foram fatores de risco para DECH aguda e maior quantidade de células CD4⁺ de memória no D+180 foi fator de risco para DECH crônica. Na DECH aguda, após sua ativação, células T de memória alorreativas causam danos em diferentes tecidos como trato gastrointestinal, fígado, pele, timo por citotoxicidade direta ou mediada por citocinas, mas ainda há dúvidas se essas células efetoras de memória presente no sangue do paciente com DECH são derivadas do enxerto, que se proliferam ao encontrar o antígeno ou se são diferenciadas de células *naive* do enxerto.⁽¹²⁴⁾ Alguns estudos sugerem que células T *naive* são ainda mais potentes na indução de DECH agudo e podem estar relacionados com formas mais graves, o que pode estar relacionado com o fato de serem os mais potentes indutores de resposta alorreativa *in vitro*. Possível explicação pode estar relacionada ao fato que células T *naive* apresentam maior repertório de TCR, maior capacidade proliferativa, resultando em maior potencial para

reconhecimento de antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos do receptor. Um estudo que avaliou a associação de células T CD4⁺ do doador infundidas com DECH agudo, encontrou que maior quantidade de células T CD4⁺ *naïve* infundidas estaria relacionada com maior risco de DECH agudo graus II-IV e DECH crônico.⁽¹²⁵⁾ O maior risco de DECH associado a linfócitos CD4⁺ *naïve* pode explicar pior sobrevida global encontrada no presente estudo com maior número de linfócitos T CD4⁺ de transição no D+60.

O presente estudo apresenta algumas limitações, principalmente relacionada ao número de pacientes incluídos nas análises, especialmente com relação a reconstituição imune CMV-específica, visto que número considerável de casos foram excluídos devido ao baixo número de células em ambos os grupos de tratamento, grande quantidade de testes estatísticos realizados devido a grande quantidade de dados gerados e a ausência de ensaios funcionais para melhor avaliação de células NK, entretanto, trata-se de estudo prospectivo, em que foram analisadas, de forma completa, a reconstituição imune dos pacientes utilizando ATG ou ciclofosfamida pós-transplante, acrescentando informações importantes para prática clínica sobre a utilização dessa forma inovadora de imunossupressão pós-transplante.

5 CONCLUSÕES

1. Em pacientes com diagnóstico onco-hematológico, submetidos a transplante alogênico com doador não aparentado, utilizando duas formas de imunossupressão pós-transplante (ATG ou ciclofosfamida pós-transplante), houve uma expansão inicial de monócitos e linfócitos NK nos 2 grupos de tratamento. No D+30, no Grupo ATG, houve maior número de linfócitos T, linfócitos B e células NK quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida, enquanto no D+180 houve maior número de linfócitos B com ciclofosfamida pós-transplante. Foi observado predomínio de linfócitos T CD8⁺ quando comparado ao linfócito T CD4⁺ desde fases precoces do transplante, permanecendo até D+180, nos 2 grupos analisados. Observamos uma população de linfócitos T duplo positivos CD4⁺ e CD8⁺ maior no Grupo da Ciclofosfamida, quando comparado ao ATG. No pré-transplante havia predomínio de linfócitos T CD4⁺ de memória e CD8⁺ *naïve* em ambos os grupos. Pós-transplante linfócitos T CD4⁺ em todos os momentos avaliados e CD8⁺, no D+30 e D+60, eram representados, fenotipicamente, em sua maioria, por linfócitos de memória. No D+90, entre os linfócitos T CD8⁺, houve predomínio de linfócitos de transição, enquanto no D+180 já observamos predomínio de linfócitos T CD8⁺ *naïve* em ambos os grupos, ainda com baixas contagens de linfócitos T CD4⁺ *naïve* e transição, comparados aos linfócitos T CD4⁺ de memória;

2. Com relação ao perfil de células NK, no D+30, no Grupo ATG, quando comparado ao Grupo Ciclofosfamida, houve maior número de células NK CD56^{dim}, CD56^{high} e CD56^{neg}, CD16^{pos} e NKG2D^{pos}. No D+60 e no D+90, no Grupo ATG, houve maior número de células CD56^{dim} e no D+180, no Grupo Ciclofosfamida, houve maior número de células NK CD56^{neg}, CD16^{pos} e NKG2D^{pos}. Não foi encontrada diferença entre os grupos com relação a reconstituição imune CMV-específica;

3. Com relação aos desfechos clínicos, altas taxas de enxertia neutrofílica em ambos os grupos, porém a enxertia neutrofílica foi mais precoce com ATG, comparado a ciclofosfamida e não foram encontradas diferenças com relação a reativação de CMV, DECH aguda graus II a IV ou III a IV e DECH crônico, bem como em sobrevida global e mortalidade relacionada ao transplante e mortalidade relacionada a recaída;

4. Maior número absoluto de CD4⁺ de transição no D+30 foi relacionado a pior sobrevida, sem diferença com relação a reconstituição imune CMV-específica;

5. Maior contagem de células CD4⁺ *naive*, CD4⁺ de transição e CD8⁺ *naive*, no D+60, foram fator de risco para DECH aguda graus II-IV, enquanto maior quantidade de células CD4⁺ de memória no D+180 foi fator de risco para DECH crônica;

6. No presente estudo, não foi possível identificar fator de risco ou proteção para reativação de CMV e não foi identificada associação entre reativação de CMV e reconstituição de resposta CMV-específica ou DECH.

6 REFERÊNCIAS

1. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, Baldomero H, Foeken L, et al. One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol*. 2015;2(3):e91-100.
2. Simone AJ, Neves HR, Silva CC, Geraldo BL, Pasquini MC, Colturato VA, et al. Current use and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: the first Brazilian summary slides. *J Bone Marrow Transplant Cell Ther*. 2021;2(2):p99.
3. Silva WF, Cysne DN, Kerbaux MN, Colturato I, Maia AC, Tucunduva L, et al. Predictive factors and outcomes after allogeneic stem cell transplantation for adults with acute lymphoblastic leukemia in Brazil. *Transplant Cell Ther*. 2022;28(11):763.e1-e7.
4. Tokaz MC, Baldomero H, Cowan AJ, Saber W, Greinix H, Koh MB, et al. An analysis of the worldwide utilization of hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Transplant Cell Ther*. 2023;29(4):279.e1-e10.
5. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92(7):2303-14.
6. 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;314(12):729-35.
7. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, Bartolomeo P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2001;98(10):2942-7.
8. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, et al. Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(5):560-5.
9. Soiffer RJ, Kim HT, McGuirk J, Horwitz ME, Johnston L, Patnaik MM, et al. Prospective, randomized, double-blind, phase III clinical trial of anti-T-lymphocyte globulin to assess impact on chronic graft-versus-host disease-free survival in patients undergoing HLA-matched unrelated myeloablative hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2017;35(36):4003-11.
10. Devillier R, Labopin M, Chevallier P, Ledoux MP, Socié G, Huynh A, et al. Impact of antithymocyte globulin doses in reduced intensity conditioning before allogeneic transplantation from matched sibling donor for patients with acute myeloid leukemia: a report from the acute leukemia working party of European group of Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(4):431-7.
11. Arai Y, Jo T, Matsui H, Kondo T, Kondo A. Efficacy of antithymocyte globulin for allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(8):1840-8.
12. Arcuri LJ, Kerbaux MN, Kerbaux LN, Santos FP, Ribeiro AA, Hamerschlak N. ATG in HLA-matched, peripheral blood, hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a secondary analysis of a CIBMTR database. *Transplant Cell Ther*. 2023;29(1):40.e1-e4.
13. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using

nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(6):641-50.

14. Al-Homsi AS, Roy TS, Cole K, Feng Y, Duffner U. Post-transplant high-dose cyclophosphamide for the prevention of graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(4):604-11.

15. Kanakry JA, Kasamon YL, Gocke CD, Tsai H-L, Davis-Sproul J, Ghosh N, et al. Outcomes of related donor HLA-identical or HLA-haploidentical allogeneic blood or marrow transplantation for peripheral T cell lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(4):602-6.

16. Ciurea SO, Mulanovich V, Saliba RM, Bayraktar UD, Jiang Y, Bassett R, et al. Improved early outcomes using a T cell replete graft compared with T cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(12):1835-44.

17. Tischer J, Engel N, Fritsch S, Prevalsek D, Hubmann M, Schulz C, et al. Virus infection in HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: incidence in the context of immune recovery in two different transplantation settings. *Ann Hematol.* 2015;94(10):1677-88.

18. Raiola AM, Dominiotto A, Ghiso A, Di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1):117-22.

19. Arcuri LJ, Hamerschlak N, Rocha V, Bonfim C, Kerbaui MN. Outcomes after haploidentical hematopoietic cell transplantation with post-transplantation cyclophosphamide: a systematic review and meta-analysis comparing myeloablative with reduced-intensity conditioning regimens and bone marrow with peripheral blood stem cell grafts. *Transplant Cell Ther.* 2021.

20. Lima VJ, Silva AF, Kerbaui LN, Kerbaui MN, Lerner D, Colares M, et al. Risk factors for adverse outcomes following haploidentical hematopoietic cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide: a two-center analysis. *Ann Hematol.* 2022;101(8):1795-802.

21. Ciurea SO, Zhang MJ, Bacigalupo AA, Bashey A, Appelbaum FR, Aljittawi OS, et al. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood.* 2015;126(8):1033-40.

22. Bashey ZA, Zhang X, Brown S, Jackson K, Morris LE, Holland HK, et al. Comparison of outcomes following transplantation with T-replete HLA-haploidentical donors using post-transplant cyclophosphamide to matched related and unrelated donors for patients with AML and MDS aged 60 years or older. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(6):756-63.

23. Arcuri LJ, Ribeiro AA, Hamerschlak N, Kerbaui MN. Posttransplant cyclophosphamide beyond haploidentical transplantation. *Ann Hematol.* 2024;103(5):1483-91.

24. Moiseev IS, Pirogova OV, Alyanski AL, Babenko EV, Gindina TL, Darskaya EI, et al. Graft-versus-host disease prophylaxis in unrelated peripheral blood stem cell transplantation with post-transplantation cyclophosphamide, tacrolimus, and mycophenolate mofetil. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(6):1037-42.

25. Mehta RS, Saliba RM, Chen J, Rondon G, Hammerstrom AE, Alousi A, et al. Post-transplantation cyclophosphamide versus conventional graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched unrelated donor haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 2016;173(3):444-55.

26. Rashidi A, Slade M, DiPersio JF, Westervelt P, Vij R, Romee R. Post-transplant high-dose cyclophosphamide after HLA-matched vs haploidentical hematopoietic cell transplantation for AML. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(12):1561-4.

27. Gooptu M, Romee R, St Martin A, Arora M, Al Malki M, Antin JH, et al. HLA-haploidentical vs matched unrelated donor transplants with posttransplant cyclophosphamide-based prophylaxis. *Blood.* 2021;138(3):273-82.

28. Battipaglia G, Galimard JE, Labopin M, Raiola AM, Blaise D, Ruggeri A, et al. Post-transplant cyclophosphamide in one-antigen mismatched unrelated donor transplantation versus haploidentical transplantation in acute myeloid leukemia: a study from the acute leukemia working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2022.
29. Bolaños-Meade J, Reshef R, Fraser R, Fei M, Abhyankar S, Al-Kadhimi Z, et al. Three prophylaxis regimens (tacrolimus, mycophenolate mofetil, and cyclophosphamide; tacrolimus, methotrexate, and bortezomib; or tacrolimus, methotrexate, and maraviroc) versus tacrolimus and methotrexate for prevention of graft-versus-host disease with haemopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning: a randomised phase 2 trial with a non-randomised contemporaneous control group (BMT CTN 1203). *Lancet Haematol*. 2019;6(3):e132-e43.
30. Luznik L, Pasquini MC, Logan B, Soiffer RJ, Wu J, Devine SM, et al. Randomized phase III BMT CTN trial of calcineurin inhibitor-free chronic graft-versus-host disease interventions in myeloablative hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2022;40(4):356-68.
31. Jurdi NE, Hoover A, O'Leary D, Cao Q, Gupta A, Ebens C, et al. Phase II study of myeloablative 7-8/8-matched allotransplantation with post-transplantation cyclophosphamide, tacrolimus, and mycophenolate mofetil. *Transplant Cell Ther*. 2023.
32. Bolaños-Meade J, Hamadani M, Wu J, Al Malki MM, Martens MJ, Runaas L, et al. Post-transplantation cyclophosphamide-based graft-versus-host disease prophylaxis. *N Engl J Med*. 2023;388(25):2338-48.
33. Gandhi MK, Wills MR, Sissons JG, Carmichael AJ. Human cytomegalovirus-specific immunity following haemopoietic stem cell transplantation. *Blood Rev*. 2003;17(4):259-64.
34. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol/Oncol Clin North Am*. 2011;25(1):151-69.
35. Jaskula E, Bochenska J, Kocwin E, Tarnowska A, Lange A. CMV serostatus of donor-recipient pairs influences the risk of CMV infection/reactivation in HSCT patients. *Bone Marrow Research*. 2012;2012:1-8.
36. Kerbaux MN, Ribeiro AA, Arcuri LJ, Kerbaux LN, Silva CC, Camargo LF, et al. Clinical impact of multiple DNA virus infections in nondepleted haploidentical and unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2021:e13626.
37. Boeckh M. Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy. *Transpl Infect Dis*. 1999;1(3):165-78.
38. Crocchiolo R, Bramanti S, Vai A, Sarina B, Mineri R, Casari E, et al. Infections after T-replete haploidentical transplantation and high-dose cyclophosphamide as graft-versus-host disease prophylaxis. *Transpl Infect Dis*. 2015;17(2):242-9.
39. Baker M, Wang H, Rowley SD, Cai L, Pecora AL, Skarbnik A, et al. Comparative outcomes after haploidentical or unrelated donor bone marrow or blood stem cell transplantation in adult patients with hematological malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(11):2047-55.
40. Huntley D, Giménez E, Pascual MJ, Hernández-Boluda JC, Gago B, Vázquez L, et al. Incidence, features, and outcomes of cytomegalovirus DNAemia in unmanipulated haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with post-transplantation cyclophosphamide. *Transpl Infect Dis*. 2020;22(1):e13206.
41. Goldsmith SR, Abid MB, Auletta JJ, Bashey A, Beitinjaneh A, Castillo P, et al. Post-transplant cyclophosphamide (PTCy) is associated with increased cytomegalovirus infection: a CIBMTR analysis. *Blood*. 2021.

42. Slade M, Goldsmith S, Romee R, DiPersio JF, Dubberke ER, Westervelt P, et al. Epidemiology of infections following haploidentical peripheral blood hematopoietic cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2017;19(1).
43. Goldsmith SR, Slade M, DiPersio JF, Westervelt P, Lawrence SJ, Uy GL, et al. Cytomegalovirus viremia, disease, and impact on relapse in T-cell replete peripheral blood haploidentical hematopoietic cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Haematologica*. 101. Italy 2016. p. e465-e8.
44. Green ML, Leisenring W, Xie H, Mast TC, Cui Y, Sandmaier BM, et al. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol*. 2016;3(3):e119-27.
45. Camargo JF, Kimble E, Rosa R, Shimose LA, Bueno MX, Jeyakumar N, et al. Impact of cytomegalovirus viral load on probability of spontaneous clearance and response to preemptive therapy in allogeneic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(4):806-14.
46. Borst EM, Kleine-Albers J, Gabaev I, Babic M, Wagner K, Binz A, et al. The human cytomegalovirus UL51 protein is essential for viral genome cleavage-packaging and interacts with the terminase subunits pUL56 and pUL89. *J Virol*. 2013;87(3):1720-32.
47. Reefschlaeger J, Bender W, Hallenberger S, Weber O, Eckenberg P, Goldmann S, et al. Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(6):757-67.
48. Weber O, Bender W, Eckenberg P, Goldmann S, Haerter M, Hallenberger S, et al. Inhibition of murine cytomegalovirus and human cytomegalovirus by a novel non-nucleosidic compound in vivo. *Antiviral Res*. 2001;49(3):179-89.
49. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, et al. Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2017;377(25):2433-44.
50. Ljungman P, Schmitt M, Marty FM, Maertens J, Chemaly RF, Kartsonis NA, et al. A mortality analysis of letermovir prophylaxis for cytomegalovirus (CMV) in CMV-seropositive recipients of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2020;70(8):1525-33.
51. van den Brink MR, Velardi E, Perales MA. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:215-9.
52. Elfeky R, Lazareva A, Qasim W, Veys P. Immune reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation using different stem cell sources. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(7):735-51.
53. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.
54. Minculescu L, Marquart HV, Friis LS, Petersen SL, Schiødt I, Ryder LP, et al. Early natural killer cell reconstitution predicts overall survival in T cell-replete allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(12):2187-93.
55. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med*. 1995;332(3):143-9.
56. Fagnoni FF, Lozza L, Zibera C, Zambelli A, Ponchio L, Gibelli N, et al. T-cell dynamics after high-dose chemotherapy in adults: elucidation of the elusive CD8+ subset reveals multiple homeostatic T-cell compartments with distinct implications for immune competence. *Immunology*. 2002;106(1):27-37.
57. Velardi E, Tsai JJ, van den Brink MRM. T cell regeneration after immunological injury. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(5):277-91.

58. Storek J, Gooley T, Witherspoon RP, Sullivan KM, Storb R. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *Am J Hematol.* 1997;54(2):131-8.
59. Dulude G, Brochu S, Fontaine P, Baron C, Gyger M, Roy DC, et al. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp Hematol.* 1997;25(9):992-1004.
60. Storek J, Wells D, Dawson MA, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2001;98(2):489-91.
61. Kröger N, Zagrivnaja M, Schwartz S, Badbaran A, Zabelina T, Lioznov M, et al. Kinetics of plasma-cell chimerism after allogeneic stem cell transplantation by highly sensitive real-time PCR based on sequence polymorphism and its value to quantify minimal residual disease in patients with multiple myeloma. *Exp Hematol.* 2006;34(5):688-94.
62. 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;44(8):457-62.
63. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol.* 2008;127(1):14-25.
64. Abdel-Azim H, Elshoury A, Mahadeo KM, Parkman R, Kapoor N. Humoral immune reconstitution kinetics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a maturation block of igh memory B cells may lead to impaired antibody immune reconstitution. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(9):1437-46.
65. D'Orsogna LJ, Wright MP, Krueger RG, McKinnon EJ, Buffery SI, Witt CS, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients have defects of both switched and igh memory B cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(7):795-803.
66. Dybko J, Giordano U, Pilch J, Mizera J, Borkowski A, Mordak-Domagala M. Comparison of different rabbit anti-thymocyte globulin formulations in the prophylaxis of graft-versus-host disease: a systematic review. *J Clin Med.* 2023;12(17).
67. Veys P, Wynn RF, Ahn KW, Samarasinghe S, He W, Bonney D, et al. Impact of immune modulation with in vivo T-cell depletion and myeloablative total body irradiation conditioning on outcomes after unrelated donor transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2012;119(25):6155-61.
68. Koning C, Admiraal R, Nierkens S, Boelens JJ. Immune reconstitution and outcomes after conditioning with anti-thymocyte-globulin in unrelated cord blood transplantation; the good, the bad, and the ugly. *Stem Cell Investig.* 2017;4:38.
69. Willemsen L, Jol-van der Zijde CM, Admiraal R, Putter H, Jansen-Hoogendijk AM, Ostaijen-Ten Dam MM, et al. Impact of serotherapy on immune reconstitution and survival outcomes after stem cell transplantations in children: thymoglobulin versus alemtuzumab. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(3):473-82.
70. Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, Lankester AC, Bierings MB, Egberts TC, et al. Association between anti-thymocyte globulin exposure and CD4+ immune reconstitution in paediatric haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol.* 2015;2(5):e194-203.
71. Tian DM, Wang Y, Zhang XH, Liu KY, Huang XJ, Chang YJ. Rapid recovery of CD3+CD8+ T cells on day 90 predicts superior survival after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156777.

72. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, Bolaños-Meade J, Thoburn C, Perkins B, et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med*. 2013;5(211):211ra157.
73. Kanakry CG, Coffey DG, Towler AM, Vulic A, Storer BE, Chou J, et al. Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. *JCI Insight*. 2016;1(5).
74. Wachsmuth LP, Patterson MT, Eckhaus MA, Venzon DJ, Gress RE, Kanakry CG. Post-transplantation cyclophosphamide prevents graft-versus-host disease by inducing alloreactive T cell dysfunction and suppression. *J Clin Invest*. 2019;129(6):2357-73.
75. Rambaldi B, Kim HT, Reynolds C, Chamling Rai S, Arihara Y, Kubo T, et al. Impaired T- and NK-cell reconstitution after haploidentical HCT with posttransplant cyclophosphamide. *Blood Adv*. 2021;5(2):352-64.
76. Russo A, Oliveira G, Berglund S, Greco R, Gambacorta V, Cieri N, et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood*. 2018;131(2):247-62.
77. Finke J, Brugger W, Bertz H, Behringer D, Kunzmann R, Weber-Nordt RM, et al. Allogeneic transplantation of positively selected peripheral blood CD34+ progenitor cells from matched related donors. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18(6):1081-6.
78. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood*. 2014;124(5):822-6.
79. Abboud R, Keller J, Slade M, DiPersio JF, Westervelt P, Rettig MP, et al. Severe cytokine-release syndrome after T cell-replete peripheral blood haploidentical donor transplantation is associated with poor survival and anti-IL-6 therapy is safe and well tolerated. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(10):1851-60.
80. McCurdy SR, Radojcic V, Tsai HL, Vulic A, Thompson E, Ivcevic S, et al. Signatures of GVHD and relapse after posttransplant cyclophosphamide revealed by immune profiling and machine learning. *Blood*. 2022;139(4):608-23.
81. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(5):1232-40.
82. Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood*. 1994;83(7):1971-9.
83. McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, Tanamachi B, Li CR, Zaia JA, et al. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol*. 1994;43(1):103-10.
84. Khan N, Cobbold M, Keenan R, Moss PA. Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis*. 2002;185(8):1025-34.
85. Luo XH, Huang XJ, Liu KY, Xu LP, Liu DH. Protective immunity transferred by infusion of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells within donor grafts: its associations with cytomegalovirus reactivation following unmanipulated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(7):994-1004.
86. Kato R, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Taniguchi K, et al. Early detection of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes against cytomegalovirus antigenemia in human leukocyte antigen haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2015;94(10):1707-15.

87. Noviello M, Forcina A, Veronica V, Crocchiolo R, Stanghellini MT, Carrabba M, et al. Early recovery of CMV immunity after HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation as a surrogate biomarker for a reduced risk of severe infections overall. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(9):1262-4.
88. Huntley D, Giménez E, Pascual MJ, Remigia MJ, Amat P, Vázquez L, et al. Reconstitution of cytomegalovirus-specific T-cell immunity following unmanipulated haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55(7):1347-56.
89. Huntley D, Giménez E, Pascual MJ, Vázquez L, Amat P, Remigia MJ, et al. Peripheral blood regulatory T cells and occurrence of Cytomegalovirus DNAemia after unmanipulated haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55(7):1493-6.
90. Van Beek JJ, Puccio S, Roberto A, Paoli F, Graziano G, Salviato E, et al. Single-cell profiling reveals the dynamics of cytomegalovirus-specific T cells in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2021;106(10):2768-73.
91. Jin F, Lin H, Gao S, Wang H, Yan H, Guo J, et al. Characterization of IFN γ -producing natural killer cells induced by cytomegalovirus reactivation after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Oncotarget.* 2017;8(1):51-63.
92. Jang JE, Hwang DY, Chung H, Kim SJ, Eom JI, Jeung HK, et al. Early cytomegalovirus reactivation and expansion of CD56. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(10):2070-8.
93. Muccio L, Bertaina A, Falco M, Pende D, Meazza R, Lopez-Botet M, et al. Analysis of memory-like natural killer cells in human cytomegalovirus-infected children undergoing $\alpha\beta$ +T and B cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Haematologica.* 2016;101(3):371-81.
94. Zaghi E, Calvi M, Puccio S, Spata G, Terzoli S, Peano C, et al. Single-cell profiling identifies impaired adaptive NK cells expanded after HCMV reactivation in haploidentical HSCT. *JCI Insight.* 2021;6(12).
95. Nesher L, Shah DP, Ariza-Heredia EJ, Azzi JM, Siddiqui HK, Ghantoji SS, et al. Utility of the enzyme-linked immunospot interferon- γ -release assay to predict the risk of cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplant recipients. *J Infect Dis.* 2016;213(11):1701-7.
96. Chemaly RF, El Haddad L, Winston DJ, Rowley SD, Mulane KM, Chandrasekar P, et al. Cytomegalovirus (CMV) cell-mediated immunity and CMV infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation: the REACT study. *Clin Infect Dis.* 2020;71(9):2365-74.
97. El Haddad L, Ariza-Heredia E, Shah DP, Jiang Y, Blanchard T, Ghantoji SS, et al. The ability of a cytomegalovirus ELISPOT assay to predict outcome of low-level CMV reactivation in hematopoietic cell transplant recipients. *J Infect Dis.* 2019;219(6):898-907.
98. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis.* 2017;64(1):87-91.
99. Cesaro S, Dalianis T, Rinaldo C, Koskenvuo M, Pegoraro A, Einsele H, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(1):12-21.
100. Ali N, Sharma AA, Rezende AC, Otegbeye F, Latif BM, Kerbaui MN, et al. Targeted marrow irradiation intensification of reduced-intensity fludarabine/busulfan conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Cell Ther.* 2022;28(7):370.e1-e10.

101. Kerbaudy MN, Arcuri LJ, Favareto SL, Rezende AC, Hamerschlag N. Total marrow irradiation in hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1155954.
102. Kotecha N, Krutzik PO, Irish JM. Web-based analysis and publication of flow cytometry experiments. *Curr Protoc Cytom*. 2010;Chapter 10:Unit10.7.
103. Moretta L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood*. 2010;116(19):3689-91.
104. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(10):3121-7.
105. Bühlmann L, Buser AS, Cantoni N, Gerull S, Tichelli A, Gratwohl A, et al. Lymphocyte subset recovery and outcome after T-cell replete allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(10):1357-62.
106. Abrahamsen IW, Sømme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D, Tjønnfjord GE. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2005;90(1):86-93.
107. Nguyen S, Kuentz M, Vernant JP, Dhedin N, Bories D, Debré P, et al. Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Leukemia*. 2008;22(2):344-52.
108. Eissens DN, Schaap NP, Preijers FW, Dolstra H, van Cranenbroek B, Schattenberg AV, et al. CD3+/CD19+-depleted grafts in HLA-matched allogeneic peripheral blood stem cell transplantation lead to early NK cell cytolytic responses and reduced inhibitory activity of NKG2A. *Leukemia*. 2010;24(3):583-91.
109. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, Kuentz M, Al Jijakli A, Rouas-Freiss N, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*. 2005;105(10):4135-42.
110. Kheav VD, Busson M, Scieux C, Peffault Latour R, Maki G, Haas P, et al. Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014;99(12):1860-7.
111. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, et al. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood*. 2011;118(10):2784-92.
112. Cooley S, McCullar V, Wangen R, Bergemann TL, Spellman S, Weisdorf DJ, et al. KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood*. 2005;106(13):4370-6.
113. Wang H, Grzywacz B, Sukovich D, McCullar V, Cao Q, Lee AB, et al. The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. *Blood*. 2007;110(5):1530-9.
114. Park KH, Ryu JH, Bae H, Yun S, Jang JH, Han K, et al. Delayed NK cell reconstitution and reduced NK activity increased the risks of CMV disease in allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
115. Cocker AT, Liu F, Djaoud Z, Guethlein LA, Parham P. CD56-negative NK cells: frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity, and KIR expression. *Front Immunol*. 2022;13:992723.
116. Alhaj Hussien K, Michonneau D, Biajoux V, Keita S, Dubouchet L, Nelson E, et al. CD4+ CD8+ T-lymphocytes in xenogeneic and human graft-versus-host disease. *Front Immunol*. 2020;11:579776.

117. Hess NJ, Turicek DP, Riendeau J, McIlwain SJ, Contreras Guzman E, Nadiminti K, et al. Inflammatory CD4/CD8 double-positive human T cells arise from reactive CD8 T cells and are sufficient to mediate GVHD pathology. *Sci Adv.* 2023;9(12):eadf0567.
118. Battipaglia G, Labopin M, Kröger N, Vitek A, Afanasyev B, Hilgendorf I, et al. Posttransplant cyclophosphamide vs antithymocyte globulin in HLA-mismatched unrelated donor transplantation. *Blood.* 2019;134(11):892-9.
119. Modi D, Kondrat K, Kim S, Deol A, Ayash L, Ratanatharathorn V, et al. Post-transplant cyclophosphamide versus thymoglobulin in hla-mismatched unrelated donor transplant for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Transplant Cell Ther.* 2021;27(9):760-7.
120. Imus PH, Tsai HL, DeZern AE, Jerde K, Swinnen LJ, Bolaños-Meade J, et al. Thrombotic microangiopathy after post-transplantation cyclophosphamide-based graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2020;26(12):2306-10.
121. Epperla N, Li A, Logan B, Fretham C, Chhabra S, Aljurf M, et al. Incidence, risk factors for and outcomes of transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Br J Haematol.* 2020;189(6):1171-81.
122. Nykolyszyn C, Granata A, Pagliardini T, Castagna L, Harbi S, Bouabdallah R, et al. Posttransplantation cyclophosphamide vs. antithymocyte globulin as GVHD prophylaxis for mismatched unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55(2):349-55.
123. Irene GC, Albert E, Anna BV, Rahinatu A, Silvana N, Silvana S, et al. Patterns of infection and infectious-related mortality in patients receiving post-transplant high dose cyclophosphamide as graft-versus-host-disease prophylaxis: impact of HLA donor matching. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56(4):818-27.
124. Dekker L, Sanders E, Lindemans CA, Koning C, Nierkens S. Naive T cells in graft versus host disease and graft versus leukemia: innocent or guilty? *Front Immunol.* 2022;13:893545.
125. Chang YJ, Zhao XY, Huo MR, Huang XJ. Expression of CD62L on donor CD4(+) T cells in allografts: correlation with graft-versus-host disease after unmanipulated allogeneic blood and marrow transplantation. *J Clin Immunol.* 2009;29(5):696-704.

Abstract

Introduction: Recently, new forms of immunosuppression in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation have been developed, such as the use of post-transplant cyclophosphamide, responsible for the success of haploidentical stem cell transplantation, what has also been used in unrelated transplantation, with promising results. However, data on immune reconstitution with this type of immunosuppression have been little studied so far. Immune reconstitution is directly involved with post-transplant morbidity and mortality, being related to viral reactivations and infections, such as cytomegalovirus. **Purpose:** We aim to evaluate global and cytomegalovirus-specific immune reconstitution after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation, comparing thymoglobulin or post-transplant cyclophosphamide. **Methods:** We prospectively included patients undergoing unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation with thymoglobulin or post-transplant cyclophosphamide. We collected clinical and demographic data from patients and peripheral blood to perform analysis of global and cytomegalovirus-specific immune reconstitution on days +30, +60, +90, +180. Immune reconstitution analyzes were performed by flow cytometry and cytomegalovirus-specific recovery by Elispot technique. **Results:** Thirty-six patients were included in this study, 20 in the Thymoglobuline Group and 16 in the Cyclophosphamide Group. Regarding clinical outcomes, high rates of neutrophilic engraftment were observed in both groups, however neutrophilic engraftment was earlier with thymoglobuline (median of 12 days), compared to cyclophosphamide (median of 16 days) ($p=0.0001$). There was no difference between the groups in terms of length of hospital stay, cytomegalovirus reactivation, acute graft vs host disease grades II to IV or III to IV, and chronic graft vs host disease, as well as overall survival and transplant-related mortality and relapse-related mortality. Regarding immune reconstitution, early post-transplant, at D+30, in the Thymoglobuline Group, when compared to the Cyclophosphamide Group, there was a greater number of T, B and NK lymphocytes, in addition to CD56^{high}, CD56^{dim} and CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos} NK cells. However, at D+180, there was a greater number of B lymphocytes in the Cyclophosphamide Group. On D+60 and D+90, in the Thymoglobuline Group, there was a greater number of NK cells CD56^{dim} compared to the Cyclophosphamide Group, while on D+180, in the Cyclophosphamide Group, there were a greater number of NK cells CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos} NK cells. Furthermore, a

population of CD4 and CD8 double-positive T lymphocytes was found, with a predominance in the Cyclophosphamide Group at D+180. Naïve CD4⁺, transition CD4 and naïve CD8⁺ T cells on D+60 were risk factors for acute graft vs host disease grades II-IV and a higher CD4⁺ memory cells on D+180 was a risk factor for chronic graft vs host disease. **Conclusions:** In the context of unrelated allogeneic transplantation, immunosuppression with thymoglobuline was related to a greater number of T, B and NK lymphocytes on D+30, but a lower count of B lymphocytes on D+180, in addition to a greater number of CD56^{dim} NK lymphocytes in D+60 and D+90. Immunosuppression with cyclophosphamide was related to a greater population of CD4 and CD8 double positive T lymphocytes and a greater number of CD56^{neg}, CD16^{pos}, NKG2D^{pos} NK cells at D+180.

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03818334

Keywords: Cyclophosphamide; Cytomegalovirus infections; Stem cell transplantation; Virus diseases; Immune reconstitution