

**RECONSTITUIÇÃO HEMATO-IMUNOLÓGICA APÓS O  
TRANSPLANTE DE CÉLULAS ESTAMINAIS  
HEMATOPOIÉTICAS: RECUPERAÇÃO DA POLICLONALIDADE  
DOS LINFÓCITOS T E B E DA FUNCIONALIDADE DAS  
CÉLULAS NK**

**DÁRIO JOSÉ PIRRALHA LIGEIRO**

**Tese para Obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Vida  
na Especialidade em Imunologia  
na Faculdade de Ciências Médicas**

**Junho, 2016**



**RECONSTITUIÇÃO HEMATO-IMUNOLÓGICA APÓS O  
TRANSPLANTE DE CÉLULAS ESTAMINAIS  
HEMATOPOIÉTICAS: RECUPERAÇÃO DA POLICLONALIDADE  
DOS LINFÓCITOS T E B E DA FUNCIONALIDADE DAS  
CÉLULAS NK**

**DÁRIO JOSÉ PIRRALHA LIGEIRO**

**Orientador: Professora Doutora Maria Gomes da Silva**

**Coorientador: Professor Doutor Manuel Abecasis**

**Tese para Obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Vida  
na Especialidade em Imunologia  
na Faculdade de Ciências Médicas**

**Junho, 2016**



**As opiniões expressas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do seu autor.**



**Todo o trabalho laboratorial conducente à presente dissertação foi realizado no Centro de Sangue e Transplantação de Lisboa, Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP.**



## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Hélder Trindade, com quem tenho feito todo o meu percurso profissional desde há 20 anos, primeiro pela confiança pessoal, mas também pelos constantes desafios proporcionando sempre as melhores condições para os concretizar. Ainda pelo exemplo de retidão, juízo e sabedoria que transmite a todos com quem trabalha.

Ao Professor Doutor Manuel Abecasis, pela confiança que me depositou ao aceitar orientar este trabalho e ao mobilizar na UTM todas as condições necessárias para a sua concretização.

À Professora Doutora Maria Gomes da Silva, que aceitou orientar este trabalho numa fase avançada consignando-me um voto de confiança pessoal muito significativo.

Aos Hematologistas e Clínicos da UTM do IPOLFG pela dedicação aos doentes e apoio a este trabalho. Um grande apreço e reconhecimento à Carla Espadinha pela compilação de dados clínicos e às secretárias da UTM Isabel Correia, Márcia Oliveira, Cláudia Esteves e Mónica Cunha que durante 4 anos geriram as colheitas programadas de amostras dos doentes. Este trabalho só foi possível devido ao seu empenho.

Aos doentes, que consentiram a sua participação neste trabalho, que espero, seja um pequeno contributo para o conhecimento de doenças que causam um sofrimento terrível.

Às minhas colegas Alice Lima e Olga Abade pela ajuda incondicional na aquisição e análise de uma quantidade descomunal de dados. Aos meus colegas Ana Paula Almeida e Pedro Venturini pela ajuda no laboratório e na construção de muitas tabelas de dados. A todos os meus colegas do Centro de Sangue e Transplantação de Lisboa, que permitiram as minhas prolongadas ausências mesmo que estivesse presente.

I have been favored to work with Alicia Sanchez-Mazas and Stéphane Buhler from University of Geneva, Switzerland for many years now. In this work they shared their software tools and time for some of the genetic analysis. Thank you, for your support my dear friends.

À minha colega e amiga Sandra Tafulo, do Centro de Sangue e Transplantação do Porto pela cuidada revisão do texto com uma particular atenção para as regras do acordo ortográfico.

À Adriana Albuquerque e à Maria Soares do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina de Lisboa, pela formação em FlowJo e cooperação que foi tão importante para a minha compreensão das subtilezas da definição de subpopulações celulares por citometria de fluxo.

Aos meus Pais, Irmã e Avó, por todo o carinho e apoio mesmo nas ausências mais prolongadas.

À minha esposa Paula Videira e à minha filha Helena Ligeiro, pelo vosso apoio e amor sempre presente. Paula, muito obrigada por fazeres comigo o percurso que estabelecemos os dois há 23 anos atrás quando percebemos que partilhávamos muitos interesses e também a ciência. És desde sempre o meu exemplo de perseverança, dedicação e integridade.

## Resumo

O transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCE) é um processo terapêutico usado no tratamento de doenças genéticas e malignas de modo a reconstituir uma hematopoiese normal e aumentar respostas antitumorais. O TCE é feito num contexto autólogo (autoTCE) de forma a recuperar a função da medula óssea após a utilização de terapia antitumoral de alta intensidade. Já o TCE alogénico (aloTCE) envolve sempre um condicionamento inicial mieloablativo, cito-redutor e imunossupressor que permite a aceitação do enxerto e simultaneamente, se for o caso, o controlo de doença tumoral. A recuperação pós-transplante envolve uma regeneração total da hematopoiese, desde a recolonização pelas células do enxerto dos nichos estaminais da medula óssea, ao desenvolvimento, maturação e diferenciação efetora das diversas linhagens celulares sanguíneas e imunológicas. A regeneração é progressiva, mas prolongada, e neste período os doentes apresentam-se severamente imunocomprometidos devido à imaturidade funcional e à restrição da diversidade estrutural dos repertórios linfocitários. No aloTCE, o processo é ainda mais dificultado com a profilaxia e/ou as complicações imunológicas derivam da aloreatividade.

Este trabalho teve como objetivo fazer uma avaliação da reconstituição hematoimunológica após o autoTCE e aloTCE. Pretendeu-se, com uma análise abrangente a todos os compartimentos celulares periféricos com atividade imunológica, relacionar e integrar a dinâmica dos processos celulares observados, com os fatores clínicos do transplante e os mecanismos regulatórios da ontogenia hematopoiética e da diferenciação imunológica.

Começou-se por estabelecer uma análise da consolidação da recuperação mieloide, nos grupos de doentes com autoTCE e aloTCE, com a avaliação da granulopoiese e monopoiese após o arranque hematológico. Nestas séries de doentes, a recuperação e consolidação da granulopoiese para valores no intervalo normal mostrou-se dependente das características do enxerto. Alguns transplantes alogénicos usaram enxertos de medula óssea (MO) com uma dosagem significativamente inferior de células CD34<sup>+</sup> comparativamente às colheitas de células estaminais mobilizadas para o sangue periférico (PBSCs). Os doentes com enxerto de MO apresentaram uma capacidade menor de recompor uma granulopoiese com contagens normais de neutrófilos aos 3, aos 6 e também aos 12 meses de evolução.

A reconstituição da linfopoiese revelou dinâmicas muito diferentes para as populações e subpopulações de células NK, linfócitos B e T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a cinética da recuperação e maturação de cada compartimento celular foi normalmente superior nos transplantes autólogos em relação aos alogénicos.

A recuperação das células NK nos doentes com enxerto alogénico foi caracterizada por uma expansão inicial das frações celulares imaturas  $CD56^{++}CD16^{-}$  e  $CD56^{++}CD16^{+}$ . No entanto, estes doentes apresentaram um arresto da maturação do compartimento de células NK. Observou-se uma recuperação lenta das células maduras  $CD56^{dim}CD16^{+}$  e níveis muito baixos da população de células NK  $CD56^{-}CD16^{+}$  terminalmente diferenciadas em todos os pontos de análise. Já os doentes com transplante autólogo não apresentaram uma acumulação inicial tão extensa das células imaturas  $CD56^{++}$ , e a meio do período da análise, as células NK maduras  $CD56^{dim}CD16^{+}$  apresentaram contagens no intervalo normal. O processo de recuperação e desenvolvimento do compartimento celular NK após o transplante deverá ser muito provavelmente determinado pelos níveis de citocinas homeostáticas como a IL-15, e também, pelos níveis de células produtoras de citocinas modeladoras do desenvolvimento celular como a IL-2. De facto, neste trabalho, a evolução da recuperação e maturação das células NK foi correlacionada com a dimensão que os compartimentos de células T  $CD4^{+}$  e  $CD8^{+}$  apresentam nas fases iniciais da evolução dos transplantes. Os transplantes com contagens celulares T superiores apresentam uma expansão limitada de células imaturas  $CD56^{++}$  e uma maior capacidade de maturação do compartimento NK. As células T  $CD8^{+}$  e em especial as subpopulações de memória são particularmente sensíveis à IL-15. Os transplantes autólogos apresentam níveis iniciais mais elevados de células T comparativamente ao transplantes alogénicos provavelmente devido à ausência de um condicionamento imunossupressor presente nos segundos transplantes. Desta forma, nos transplantes autólogos e também nos doentes com transplante alogénico que fizeram uma recuperação inicial forte dos compartimentos de células T, a IL-15 disponível deverá ter sido utilizada em larga medida pela população maioritária de células T  $CD8^{+}$ . A disponibilidade da apresentação desta citocina às células  $CD56^{++}$  é então limitada o que poderá justificar a expansão moderada destas células observada nestes grupos de doentes. Por outro lado, os níveis mais elevados de células T  $CD4^{+}$  nestes grupos possibilitam uma maior produção de IL-2, que é fundamental para o processo de maturação das células NK. Foi avaliada a diversidade genética dos genes dos recetores de células NK com domínios Ig (KIR) e foi avaliada a expressão genética do repertório de recetores das células NK no pós-transplante. A diversidade e a organização do cluster de genes KIR presente na população portuguesa está relacionada com encontrada na população caucasiana europeia. Nestas populações existe um balanceamento entre os repertórios de genes inibitórios e de ativação que resulta numa maior frequência de indivíduos com um genótipo constituído pelo haplótipos KIR A/B. A distribuição de genes KIR no transplante é determinada pela frequência dos genes KIR na população

e o repertório de genes alocado no enxerto alogénico tem vindo a ser relacionado com a evolução clínica em alguns transplantes. O efeito aloreativo derivado da incompatibilidade do repertório KIR alocado e os ligandos do recetor parece ser determinante pelo menos no controlo da doença residual mínima derivada das leucemias mieloides. As interações do sistema de recetores KIR e de ligandos do HLA classe I foram avaliados nos transplantes alogénicos com dadores com diferentes graus de proximidade genética. Observou-se uma distribuição de interações KIR do dador – ligando do recetor independente da proximidade genética do par-dador recetor devida a uma segregação independente dos sistemas genéticos KIR e HLA, mas também em certa medida porque os vários painéis de dadores apresentam frequências genéticas KIR semelhantes.

Foi verificada também uma expressão aleatória dos genes KIR, não dependente da presença dos ligandos HLA e no contexto alogénico foi detetado um repertório de transcritos quimérico que vai progressivamente evoluindo para o genótipo do repertório estrutural NK do dador, o que indicia uma regulação estocástica dos genes germinais.

A reconstituição do compartimento linfocitário B é marcada por uma expansão de células transicionais imaturas e um atraso no processo de maturação. A análise de fatores como os sjKRECs indicadores da atividade linfopoiética B da medula óssea, a estimativa do histórico de divisões celulares e a diversidade estrutural do repertório da cadeia pesada das imunoglobulinas IGH, sugere que a recuperação celular B deverá ser estabelecida principalmente por uma neogénese celular derivada da medula óssea, enquanto os fatores homeostáticos das células B deverão promover uma sobrevivência celular, mas não proliferações expansivas. Nesta análise, verificou-se ainda que a maturação das células B, ao fim de um ano de evolução está relacionada com os níveis do primeiro semestre de sjKRECs e com a recuperação de células T CD4<sup>+</sup>.

A recuperação das subpopulações T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> é um processo imperfeito que é estabelecido em larga medida pela diferente sensibilidade de diferentes subpopulações celulares aos níveis elevados das citocinas homeostáticas do pós-transplante. A recuperação da linfopenia CD4<sup>+</sup> é mais condicionada, pois provavelmente exige intermediários celulares inibidos nas condições do pós-transplante, pelo que, a reconstituição destas células parece ser feita quase em exclusivo por renovação tímica. A deficiente recuperação deste compartimento celular, que apresenta funções reguladoras centrais é condicionadora da maturação de outros compartimentos linfocitários incluindo o B e o NK. Quanto ao compartimento T CD8<sup>+</sup> apresenta-se expandido com um repertório estrutural limitado e sinais de anergia e

senescência. Estes indicadores sugerem que estas células, em particular as subpopulações T CD8+ maduras de memória, são alvo de proliferações sistêmicas derivadas dos níveis elevados de citocinas homeostática a que são altamente sensíveis

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho, estabelecem os processos de regeneração hematopoiética e reconstituição imunológica, apontando alguns fatores de condicionamento e potenciais marcadores de evolução clínica.

## Abstract

Hematopoietic stem cell transplantation is a therapy for treatment of genetic diseases and some malignancies by fixing haematopoiesis damages or boost antitumor immune responses. Autologous grafts are used to recover severe bone marrow depleted cancer patients after high-dose chemotherapy. Allogeneic transplantation uses a myeloablative conditioning that is immunosuppressive allowing engraftment and, if necessary, provides tumour control. Post-transplant recovery includes a complete regeneration of hematopoiesis with recolonization by graft of hematopoietic stem cell niches and a progressive ontogeny settlement for all blood cell lineages. This is however; a time-delayed process on which patients' immune status is severely compromised due to immaturity and skewing of structural diversity of lymphocytes repertoires. Progress of allogeneic transplant patients is even more unsettled due to alloreactivity prophylaxis and related immune complications.

This study aims to evaluate the hemato-immunological reconstitution after autologous and allogeneic stem cell transplantation. It was established an analysis extended to several peripheral cellular immunological effectors, in order to correlate the recovery dynamics with transplant related factors and regulatory mechanisms of cell ontogeny and immunological differentiation.

It is well established that the engraftment kinetics is highly conditioned by the graft stem cell dose. In this analysis, we focused our interest in the assessment of factors affecting the consolidation of myelopoiesis after transplantation by evaluating the mid-term recovery of granulopoiesis and monopoiesis. Some of the transplants of the allogeneic series used a bone marrow (BM) graft with a significantly lower CD34<sup>+</sup> cell dosage when compared with peripheral blood mobilized stem cell grafts (PBSCs). During the time-line of the analysis a higher proportion of patients with a BM transplant showed neutrophils absolute counts beneath the normal range. Consequently, the graft type and stem cell dosage seem to be a factor affecting not the initial engraftment kinetics but also the mid-term consolidation of the myeloid recovery.

Each distinct lymphocyte cell type and subtype presented a specific reconstitution dynamic and the overall recovery kinetics of cellular levels and even maturation rate was found higher in autologous transplantation than in the allogeneic settings.

Allogeneic transplant patients showed an early expansion of immature CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> and CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> NK cell subsets. However, the maturation of NK cell compartment was found severely compromised. These patients presented a slow recovery of mature cytotoxic CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK cell counts and levels of terminally differentiated CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> cell were depleted at all time points of the analysis. The NK cell compartment of

autologous transplants showed a different recovery and maturation rate. These patients showed median immature CD56<sup>++</sup> cell levels in normal range since the earliest evaluation at 3 months and also presented a better maturation rate. By the second semester after transplant, mature CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> cell counts reached the lower boundary of normal range and also terminally differentiated CD56-CD16<sup>+</sup> cells gone normal in the analysis time line. The reconstitution of the NK cell compartment in the different transplant settings is likely driven by a different exposure of NK cell subsets to homeostatic cytokines such as IL-15 and others such as IL-2. Furthermore, according to the data here described, it is a process highly conditioned by post-transplant CD4<sup>+</sup> T cell levels and to a lesser extend with levels of CD8<sup>+</sup> T cells. In a low T cell post-transplant condition, as seen in allo-HSCT patients, a large ratio of circulating NK cells were the immature CD56<sup>++</sup>. Auto-HSCT patients, with higher T cell levels, showed an enhanced NK cell development with no accumulation of immature subsets. It is possible that an effective consumption of homeostatic cytokines by an early dominant CD8<sup>+</sup> T cell population determines a limited availability to other sensitive cells such as immature NK cells. Additionally, and while other regulatory mechanisms cannot be excluded, the observed enhancement of NK cells maturation with high levels of CD4<sup>+</sup> T cells, is most probably a result of endogenous T cell derived IL-2; that acting through the high-affinity IL-2 receptor of CD56<sup>++</sup> NK cells induce their maturation into CD56<sup>++</sup> cells with cytotoxicity competence. This is a process that is probably severely conditioned by the immunosuppressive regimens of allogeneic transplantation.

It was also established the KIR genotypic diversity in Portuguese, the allocation of KIR genes and genetic expression after transplantation. The diversity of KIR gene cluster was evaluated in Portuguese and the genotypic profiles observed were found related to the ones covered in European neighbouring populations with a balance between the activation and inhibitory KIR genes repertoire. These gene frequencies determine the KIR repertoire allocated after stem cell transplantation, which was associated with the allogeneic post-transplant outcome. It has been hypothesized that donor-derived alloreactive NK cells target recipient hematopoietic cells resulting in an antileukemia effect and a lower incidence of graft rejection. However, those effects depend on multiple factors, including disease type, presence of T cells, immunosuppressants and the repertoires of allocated *KIR* genes and recipient HLA ligands. Although non-uniformly demonstrated, the capture of NK cell alloreactivity is probably shaped by a KIR ligand incompatibility either in the setting of a HLA class I mismatched transplant, or in the presence of a donor KIR loci for which there is no recipient ligand. We evaluated donor-KIR/recipient-ligand interactions in transplants with related donors and unrelated donors found in a local registry or from abroad. A significant fraction of these

transplants had all three ligands of inhibitory receptors, and therefore, in theory were not prone to NK mediated alloreactivity. The distribution of KIR alloreactive interactions however, was found independent of the donor-recipient genetic proximity, almost certainly due to different gene segregation and a comparable KIR frequencies in the donor pools.

KIR gene expression seems to be established mainly by stochastic regulation of germinal genes and not dependent on HLA ligand presence. Allogeneic transplants showed a chimeric KIR repertoire that was gradually replaced by a donor derived genotype.

B cell compartment showed a distinct expansion of immature transitional cells and a maturation arrest. Results from sjKRECs quantifications indicates a recovery of B cell absolute counts mainly by bone marrow neogenesis. Analysis of cell divisions estimates and IGH repertoire diversity suggests that B cell homeostatic factors promote cell survival but not expansive proliferations. Subsequent recovery of mature and memory B cells was found correlated with early sjKRECs high levels and T CD4<sup>+</sup> cell recovery.

Within this analysis period, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell recovery was found highly deficient. It is modulated by cell sensitivity to post-transplant high levels of homeostatic cytokines and thymic activity. Homeostatic control of CD4<sup>+</sup> lymphopenia probably requires a cellular intermediate, not readily available, making recovery almost completely dependent on thymic renewal. T CD8<sup>+</sup> cell compartment was found highly disproportional with a skewed repertoire and signs of anergy and senescence. These are signs of systemic cell proliferations made by mature T CD8<sup>+</sup> due to high sensitivity to increased homeostatic cytokines levels.

Altogether, the data obtained in this study helps to establish the dynamics of hematological regeneration and immunological reconstitution, presenting some efficiency related factors and potential tools for monitoring transplant outcome.



## Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	vii
Índice de Figuras .....	xv
Abreviações usadas no texto .....	xvii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. As Células Estaminais, as Suas Características e Funcionalidades .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. O Desenvolvimento e Diferenciação das Células Estaminais Hematopoiéticas.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Os Nichos Estaminais da Medula Óssea e as Células Estaminais Hematopoiéticas.....	2
1.2.2. Caracterização Funcional e Fenotípica das Células Estaminais Hematopoiéticas	5
1.2.3. Os Progenitores Celulares e o Desenvolvimento das Linhagens Celulares Hematopoiéticas.....	7
1.2.4. O Desenvolvimento de Células Imunocompetentes .....	11
1.2.4.1. Os Granulócitos e as Células do Sistema Mononuclear Fagocítico derivados da Mielopoiese .....	11
1.2.4.2 A Linfopoiese, o Desenvolvimento e Regulação das Células Linfoides .....	13
1.2.4.2.1. As Células Linfoides Inatas ILCs e NK .....	13
1.2.4.2.2. O Desenvolvimento dos Linfócitos B.....	16
1.2.4.2.3. O Desenvolvimento dos Linfócitos T .....	19
<b>1.3. A Diversidade Estrutural e a Diferenciação Funcional dos Repertórios Linfocitários .....</b>	<b>23</b>
1.3.1. A Diversidade e Maturação das Células NK.....	23
1.3.1.1. Os Repertórios de Recetores NKG2, NCR e o Complexo de Recetores KIR.	23
1.3.1.2. A Diferenciação Terminal das Células NK .....	25
1.3.2. O Repertório de Linfócitos B .....	26
1.3.2.1. Os Rearranjos Somático dos Genes <i>IGH</i> , <i>IGK</i> e <i>IGL</i> .....	26
1.3.2.2. A Maturação Terminal das Células B Induzida pelas Respostas aos Antígenos .....	29
1.3.3. A Diversidade Estrutural e Funcional dos Linfócitos T .....	33
1.3.3.1. Os Loci do TCR, a Organização e Geração da Diversidade Estrutural .....	34
1.3.3.2. A Diversidade Funcional das Células T CD4 <sup>+</sup> .....	36
1.3.3.3. A Diversidade do Compartimento Celular T CD8 <sup>+</sup> .....	40
<b>1.4. O Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas.....</b>	<b>43</b>
1.4.1. Fontes de Células Estaminais Hematopoiéticas para Transplante .....	43
1.4.2. A Preparação do Doente para o Transplante .....	45
1.4.3. O Enxerto .....	45
1.4.4. O Transplante Autólogo .....	46
1.4.5. O Transplante Alogénico .....	46
1.4.5.1. As Bases Imunológicas da Aloreatividade.....	47
1.4.5.2. Complicações Imunológicas: a Rejeição de Enxerto e a Doença de Enxerto contra Hospedeiro .....	48
1.4.5.3. O Transplante Alogénico como Imunoterapia: o Efeito Enxerto versus Tumor	49
1.4.6. A Evolução e Outras Complicações do Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas.....	50
<b>2. Objetivos e Hipóteses de Trabalho.....</b>	<b>53</b>
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>57</b>

3.1. Características dos Doentes Transplantados e da População Controlo .....	57
3.1.1. Transplantes Autólogos .....	57
3.1.2. Transplantes Alogénicos .....	58
3.1.3. População Controlo .....	60
3.2. Análise Hematológica .....	61
3.3. Citometria de Fluxo e Separação de Populações Celulares por <i>FACS Cell-Sorting</i> .....	61
3.4. Isolamento Magnético de Populações Celulares .....	63
3.5. Extração de DNA, RNA e Transcrição reversa .....	64
3.6. Quantificação de sjTREC <sub>s</sub> e sjKREC <sub>s</sub> .....	65
3.7. Análise da Diversidade do CDR3 do <i>TRB</i> em Células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	67
3.9. Análise da Diversidade do CDR3 <i>IGH</i> da IgM .....	70
3.10. Genotipagem e Análise de Transcritos KIR .....	71
3.11. Análise do Quimerismo Celular em Linhagens Celulares Hematopoiéticas .....	74
3.12. Análise da Diversidade KIR na População Portuguesa. ....	75
3.13. Análise da Alocação de Genes KIR e da Distribuição de Interações entre Recetores KIR do Dador e Ligandos HLA do Doente no Transplante Alogénico. ....	76
3.14. Análise Estatística .....	77
<b>4. Resultados .....</b>	<b>79</b>
4.1. Evolução das Populações Celulares Imunocompetentes derivadas da Mielopoiese no Pós-Transplante .....	79
4.1.1. Análise da Neutropoiese Após o Período de Enxerto .....	79
4.1.1.1. Fatores Relacionados com a Consolidação da Neutropoiese .....	80
4.1.2. A Dinâmica da Recuperação da Monopoiese .....	81
4.1.3. Análise da Evolução do Quimerismo Celular da Linhagem Mieloide no Pós-aloTCE. ....	83
4.2. Análise da Recuperação da Linfopoiese e Reconstituição dos Repertórios Estruturais e Funcionais de células NK, B e T .....	84
4.2.1. A Recuperação da Linfopoiese NK .....	84
4.2.1.1. Recuperação das Células NK nos Doentes Submetidos a Transplante .....	85
4.2.1.2. Relação entre os níveis de células T e a composição celular do compartimento periférico de células NK no pós-transplante .....	87
4.2.1.3. Diversidade dos Repertórios dos Receptores KIR .....	89
4.2.1.3.1. Caracterização Genotípica do 'Cluster' de Genes KIR Numa População de Origem Portuguesa .....	89
4.2.1.3.2. Alocação dos Genes KIR no Transplante Alogénico Relacionado e Não-Relacionado .....	92
4.2.1.3.3. Distribuição de Perfis Genotípicos KIR e das Interações com os Ligandos do Recetor no Transplante Alogénico com Dador Relacionado e Dador Não-Relacionado Local ou Internacional. ....	93
4.2.1.3.4. Análise da Expressão Genética dos Recetores KIR Durante a Reconstituição do Compartimento de Células NK. ....	95
4.2.2. A Recuperação da Linfopoiese B e Reconstituição dos Repertórios Estruturais e Funcionais das Células B .....	99
4.2.2.1. A Dinâmica da Linfopoiese B Após o Transplante .....	99
4.2.2.2. Análise da Maturação e Diferenciação das Células B Após o Transplante ...	100
4.2.2.2.1. A Recuperação das Contagens Absolutas de Células B e a Expansão do Compartimento de Células CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> .....	101
4.2.2.2.2. O Desenvolvimento do Compartimento de Células B Transicionais .....	102
4.2.2.2.3. A Recuperação do Compartimento de Células B Maturas .....	105
4.2.2.3. A Diversidade Estrutural do Repertório das Células B Após o Transplante ..	106
4.2.2.4. Fatores Pré e Pós-Transplante com Impacto na Recuperação das Subpopulações de Células B com Maturação Funcional. ....	108
4.2.3. A Recuperação da Timopoiese e Reconstituição da Diversidade dos Repertórios	

Estruturais e Funcionais dos Clonotipos Celulares T .....	113
4.2.3.1. A Dinâmica da Timopoiese após o Transplante .....	113
4.2.3.2. Análise das Subpopulações Celulares T CD4 <sup>+</sup> e da sua Diversidade Estrutural Durante a Evolução dos Transplantes Autólogos.....	115
4.2.3.3. Análise dos Repertórios Estruturais e Funcionais T CD8 <sup>+</sup> Após o Transplante Autólogo .....	118
4.2.3.4. Evolução do Quimerismo Celular no Compartimento Linfoide T CD3 <sup>+</sup> após o transplante alogénico de CEHs .....	121
4.2.3.5. Análise da Dimensão do Compartimento Celular T CD4 <sup>+</sup> , Distribuição das Subpopulações Celulares e Diversidade do Repertório Estrutural Durante a Evolução dos Transplantes Alogénicos.....	122
4.2.3.6. Análise da Diversidade, Maturação e Diferenciação Funcional das Células T CD8 <sup>+</sup> Após o Transplante Alogénico.....	126
4.2.3.7. Fatores Pré e Pós-Transplante com Impacto na Recuperação Quantitativa das Subpopulações Linfocitárias T após o Transplante Autólogo de CEHs .....	129
4.2.3.8. Análise do Impacto dos Vários Fatores Clínicos na Reconstituição dos Repertórios Linfocitários T pelos Doentes com Transplante Alogénico .....	133
<b>5. Discussão e Conclusões .....</b>	<b>139</b>
5.1. Sobre a Análise da Consolidação da Recuperação das Populações Celulares Imunocompetentes Derivadas da Mielopoiese .....	139
5.2. Sobre a Recuperação e as Características do Compartimento de Células NK após o Transplante Alogénico e Autólogo .....	142
5.3. Sobre a Diversidade Genética do Repertório KIR, a Alocação e Reconstituição dos KIRs no Pós-Transplante e a Distribuição de Interações com os Ligandos do Recetor .....	147
5.4. Sobre a Diversidade Estrutural e Dinâmica da Reconstituição Quantitativa das Subpopulações de Células B .....	151
5.5. Sobre a Reconstituição Quantitativa e Qualitativa dos Repertórios de Células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	155
5.6. Perspetivas Futuras .....	161
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>163</b>
<b>Anexos: .....</b>	<b>189</b>



## Índice de Figuras

Figura 1 – Fases do desenvolvimento da hematopoiese embrionária humana e estabelecimento do ‘pool’ de CEHs definitivo.....	3
Figura 2 – Nichos estaminais hematopoiéticos da medula óssea. ....	4
Figura 3 Hierarquia da diferenciação hematopoiética.....	8
Figura 5 – Modelo de classificação funcional das ILCs e regulação do seu desenvolvimento e diferenciação.....	14
Figura 6 – Representação esquemática dos precursores celulares no desenvolvimento das células NK. ....	15
Figura 7 – Caracterização dos estádios de desenvolvimento da linfopoiese B e fatores reguladores da diferenciação. ....	17
Figura 8 – Estádios do desenvolvimento da linfopoiese T e sinais moleculares reguladores da diferenciação celular.....	20
Figura 9 – Organização genómica e diversidade do conteúdo genético do locus KIR humano. ....	25
Figura 10 – Representação esquemática da organização genómica e do rearranjo somático dos <i>loci</i> IGH, IGK e IGL. ....	27
Figura 11 – Organização genómica dos <i>loci</i> TRA, TRD e TRB e rearranjos somáticos combinatórios V(D)J para a expressão do TCR $\alpha\beta$ .....	35
Figura 12 – Diferenciação e perfis funcionais das subpopulações de células Th CD4 <sup>+</sup> efectoras.....	37
Figura 13 – Evolução temporal do transplante de células estaminais hematopoiéticas e as principais complicações clínicas associadas no pós-transplante.....	51
Figura 14 – Evolução das contagens absolutas de neutrófilos no sangue periférico dos doentes submetidos a transplante. ....	79
Figura 15 – Caracterização e quantificação da população de monócitos no pós-transplante de células hematopoiéticas .....	82
Figura 16 – Evolução do quimerismo celular do compartimento mieloide CD33 <sup>+</sup> .....	83
Figura 17 – Caracterização e quantificação por citometria de fluxo das subpopulações de células NK. ....	84
Figura 18 – Análise da reconstituição das subpopulações de células NK após o transplante autólogo e alogénico de células estaminais hematopoiéticas.....	86
Figura 20 – Evolução do quimerismo celular na população de células NK. ....	97
Figura 21 – Análise seriada da linfopoiese B no primeiro ano após o transplante de CEHs autólogas e alogénicas e avaliação do histórico de divisões celulares do compartimento B periférico. ....	99
Figura 22 – Análise da heterogeneidade das populações periféricas de células B.....	100
Figura 23 – Análise quantitativa do compartimento de células B CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> após o transplante de CEHs. ....	102
Figura 24 – Análise da composição do compartimento de células B transitórias e avaliação da correlação do seu desenvolvimento com a quantificação de sjKRECs após o transplante de CEHs. ....	104

Figura 25 – Reconstituição dos repertórios de células B maduras naïves e de memória após o transplante autólogo e alogénico de CEHs.....	105
Figura 26 – Repertório estrutural <i>IGH</i> no pós-transplante de CEHs autólogos e alogénicos.....	107
Figura 27 – Análise da atividade tímica durante o primeiro ano após o transplante autólogo e alogénico de CEHs. ....	114
Figura 28 – Dinâmica da diferenciação funcional e maturação do compartimento das células T CD4 <sup>+</sup> durante os primeiros 12 meses após o transplante autólogo de CEHs.....	116
Figura 29 – Repertório estrutural <i>TRVB</i> do compartimento T CD4 <sup>+</sup> no pós-transplante autólogos.....	118
Figura 30 – Análise da evolução das várias subpopulações do compartimento das celular T CD8 <sup>+</sup> na população de doentes com transplante autólogo. ....	119
Figura 31 – Evolução do repertório estrutural <i>TRVB</i> do compartimento T CD8 <sup>+</sup> na população de doentes com transplante autólogo.....	120
Figura 32 – Evolução do quimerismo celular no compartimento linfoide T CD3 <sup>+</sup> .	122
Figura 33 – Análise da diferenciação funcional e maturação do compartimento linfocitário T CD4 <sup>+</sup> durante os primeiros 12 meses após o transplante alogénico	123
Figura 34 – Diversidade do repertório estrutural <i>TRVB</i> durante a reconstituição do compartimento T CD4 <sup>+</sup> após o transplante alogénico de CEHs.....	125
Figura 35 – Análise qualitativa do compartimento celular T CD8 <sup>+</sup> nos doentes em recuperação de um transplante alogénico de CEHs .....	127
Figura 36 – Diversidade estrutural do repertório <i>TRVB</i> do compartimento T CD8 <sup>+</sup> na população de doentes com transplante alogénico.....	128

## Abreviações usadas no texto

Ac, anticorpo

Ag, antígeno

AloTCE, transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas

Ang-1, angiopoietina-1

APC, célula apresentadora de antígenos (antigen presenting cell)

AutoTCE, transplante autólogo de células estaminais hematopoiéticas

CD, *cluster* de diferenciação

CDR3, região determinante complementar 3 (complementary determinant region 3)

CEH, célula estaminal hematopoiética

Células NK, células citotóxicas naturais (natural killer)

CFU-GEMM, unidade de formação de colónias- granulócito eritrócito monócito megacariócito

CFU-E, unidade de formação de colónias- eritrócito

CFU-GM, unidade de formação de colónias- granulócito monócito

CFU-G, unidade de formação de colónias- granulócito

CCL, quimiocina ligando com motivo C-C (C-C motif chemokine ligand)

CCR, recetor quimiocina com motivo C-C (C-C motif chemokine recetor)

CXCL, quimiocina ligando com motivo C-X-C ligando (chemokine C-X-C motif Ligand)

CXCR, recetor de quimiocinas com motivo C-X-C (chemokine C-X-C recetor)

CTL, célula T citotóxica CD8<sup>+</sup>

DCs, células dendríticas (dendritic cells)

G-CSF, fator de crescimento de colónias granulocíticas (granulocyte colony-stimulating fator)

G-CSFR, recetor G-CSF

GM-CSF, fator de crescimento de colónias granulócitos e macrófagos (granulocyte-macrophage colony-stimulating fator)

GvHD, doença do enxerto contra o hospedeiro (graft versus host disease)

GvT, efeito de enxerto versus tumor (graft versus tumour)

ILCs, células linfoides inatas (innate lymphoid cells)

Ig, imunoglobulina

IGH, cadeia pesada das imunoglobulinas (immunoglobulin heavy chain)

IL, interleucina

IFN, interferão

KIR, recetores de células NK com domínios Ig (killer cell Ig like recetor)

HLA, antígenos leucocitários humanos (human leucocyte antigens)

MHC, complexo principal de histocompatibilidade (major histocompatibility complex)

MO, medula óssea

NEH, nicho estaminal hematopoiético

OB, osteoblastos

OPN, osteopontina

PBSC, células estaminais mobilizadas no sangue periférico (PBSC, peripheral blood stem cell)

RAG1 e RAG2, proteínas de ativação da recombinação genética 1 e 2 (Recombination-activating gene protein 1 and 2)

RI, resposta imune

RTE célula T emigrante recente do timo (Recent Thymic Emigrant)

sjKREC, círculo de excisão contendo a sequência de sinalização da recombinação de deleção do locus kappa da cadeia leve das imunoglobulinas (signal kappa-deleting recombination excision circle)

sjTREC, círculo de excisão contendo a sequência de sinalização do recetor de células T (signal joint T cell recetor excision circle)

SNS, sistema nervoso central

SMF, sistema mononuclear fagocítico

TNF, fator de necrose tumoral

TGF, fator de transformação de crescimento

TCR, recetor de células T (T cell recetor)

TCE, transplante de células estaminais hematopoiéticas

Th, células T auxiliaoras CD4<sup>+</sup>

UCB, células de sangue de cordão umbilical (umbilical cord blood cells)

VCAM, molécula de adesão celular vascular tipo 1 (Vascular Cellular Adhesion Molecule 1)

## 1. Introdução

### 1.1. As Células Estaminais, as Suas Características e Funcionalidades

Virtualmente todas as células dos tecidos e órgãos têm origem numa célula estaminal. Estaminal é o termo usado para definir as células com capacidade de autorrenovação e plasticidade de diferenciação. Esta capacidade permite às células com propriedade estaminal, não só formar os diferentes tipos de células dos tecidos e órgãos, durante o desenvolvimento embrionário e fetal, mas também, de suprir as necessidades de renovação celular do organismo adulto. O balanço entre células estaminais e células diferenciadas constitui o suporte da viabilidade funcional ao longo da vida de um organismo biológico [1].

A capacidade de autorrenovação advém de duas funcionalidades na mitose celular, a capacidade de expansão por divisão simétrica e uma capacidade de divisão assimétrica [2]. O primeiro tipo de divisão, que produz duas cópias iguais da célula, é raro, pois as células estaminais estão predominantemente num estado quiescente de não-divisão  $G_0$  [3]. O estado quiescente parece ser necessário para manter a homeostase de determinada população de células estaminais, evitando a sua exaustão precoce [4]. O segundo tipo de divisão, a divisão assimétrica, é o processo que permite a autorrenovação aliada à diferenciação celular. Nesta divisão é produzida uma célula que é uma cópia de si, mantendo o mesmo potencial, enquanto que a segunda célula prossegue uma via de diferenciação para assumir características funcionais dependentes do seu contexto de desenvolvimento [2]. A autorrenovação é uma propriedade identitária das células estaminais que as células mais diferenciadas perdem, ainda que algumas, as células progenitoras e precursoras tenham uma capacidade proliferativa clonogénica elevada [5].

Em relação à plasticidade estaminal ou potencial de diferenciação, as células podem ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes [6]. As células estaminais totipotentes constituem o zigoto e blastómero que têm potencial para formar o organismo inteiro incluindo as células extraembrionárias [7]. O desenvolvimento embrionário origina as células com potencial pluripotente, capazes de originar todas as células dos tecidos do organismo exceto o trofoblasto e placenta [2, 6, 7]. Com a organogénese o embrião diferencia dois tipos de células estaminais, as de linhagem germinativa para a produção de gâmetas; e as de linhagem somática multipotentes com uma plasticidade de diferenciação limitada somente a um repertório de linhagens celulares que constituem um tecido [6]. As células multipotentes mais

extensivamente caracterizadas são as células estaminais hematopoiéticas (CEHs) existentes na medula óssea (MO) e no sangue de cordão umbilical. Estas são atualmente as únicas células estaminais com aplicação clínica bem estabelecida em transplantação como enxertos autólogos e alogênicos.

As células estaminais adultas oligopotententes apresentam uma capacidade diferenciação restrita uma linhagem celular e são exemplos os progenitores linfoides e mieloides [8]. Finalmente, são reconhecidas as células estaminais unipotentes que podem diferenciar-se num único tipo celular mas que têm capacidade de autorrenovação, são exemplos as células estaminais da epiderme e as células estaminais germinais [6].

## **1.2. O Desenvolvimento e Diferenciação das Células Estaminais Hematopoiéticas**

Com exceção de alguns tipos de linfócitos especializados, as células sanguíneas maduras são em larga maioria de vida muito curta, o que obriga a um provimento contínuo destas células [9]. Por outro lado, situações de stress biológico, como uma lesão hemorrágica, condições de anemia ou infecção exigem uma capacidade de produção reativa destas células para repor a homeostase do organismo.

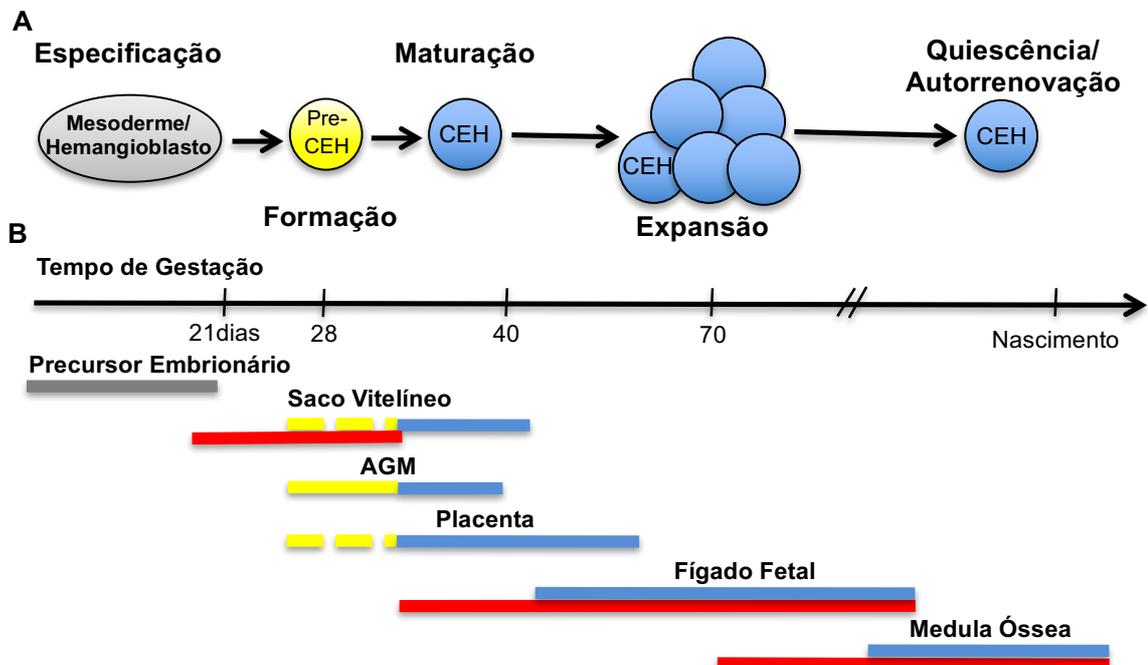
As CEHs dão origem a progenitores e precursores celulares que progressivamente assumem uma restrição para uma diferenciação a uma linhagem celular [10] até à maturidade funcional. Com este processo de diferenciação surgem as células maduras do sangue, os eritrócitos, os megacariócitos/plaquetas, as células mieloides (monócitos/ macrófagos, eosinófilos e neutrófilos), os linfócitos e outras células residentes em tecidos como os osteoclastos e mastócitos [11].

No homem adulto estima-se que as CEHs e os progenitores derivados, são responsáveis por gerar, por hora, cerca de  $1 \times 10^9$  eritrócitos e  $1 \times 10^8$  leucócitos, mantendo as proporções das diferentes linhagens leucocitárias, bem como a renovação plaquetária necessária à homeostase da trombopoiese [12]. Este processo de formação, desenvolvimento e maturação das diferentes linhagens celulares do sangue com origem num tipo de célula estaminal pluripotente, as CEHs, denomina-se hematopoiese.

### **1.2.1. Os Nichos Estaminais da Medula Óssea e as Células Estaminais Hematopoiéticas**

As células mais primitivas com potencial de diferenciação hematopoiético são originadas a partir do folheto embrionário da mesoderme, são as células

hematopoiéticas embrionárias [13]. Com o desenvolvimento embrionário há a formação de CEHs definitivas noutros tecidos, como as artérias umbilicais e vitelinas [14] e na placenta, [15] estabelecendo-se um *pool* de CEHs definitivas. A partir desta fase, tal como esquematizado na figura 1, é iniciado um processo de colonização pelas CEHs por vários tecidos rudimentares como o timo, o baço e principalmente o fígado [16, 17].



**Figura 1 – Fases do desenvolvimento da hematopoiese embrionária humana e estabelecimento do ‘pool’ de CEHs definitivo.**

(A) O desenvolvimento hematopoiético é iniciado por uma linha de precursores celulares da mesoderme do blastocisto (cinzento) que origina uma estrutura, o hemangioblasto, que diferencia células precursoras com potencial hematopoiético e vascular. Os precursores de CEHs (amarelo) sofrem um processo de maturação (azul) que lhes permite implantarem, sobreviverem e autorrenovarem nos futuros nichos estaminais hematopoiéticos. Ulteriormente a este processo de diferenciação, as CEHs fetais expandem rapidamente no fígado fetal após o qual migram e estabelecem-se nos nichos definitivos da MO onde adotam um equilíbrio entre estado quiescente e divisório. (B) Linha temporal definindo os locais embrionários com atividade hematopoiética. Linha cinzenta, mesoderme; linha vermelha, locais de diferenciação hematopoiética ativa; linha amarela, locais de génese de CEHs, linha amarela quebrada, locais em que não foi provada a génese de novo de CEHs, linha azul, locais em estão presentes CEHs funcionais adultos. (adaptado de Mikkola, H. et al., 2006, [18]).

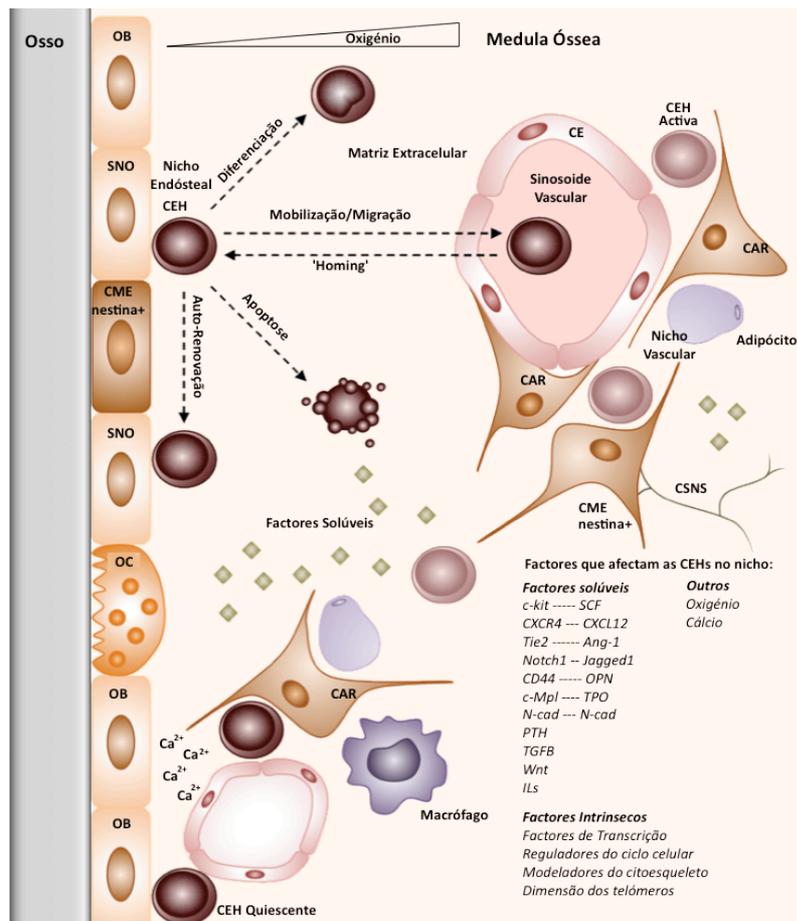
O fígado fetal é o órgão hematopoiético fetal primário que serve de local para a expansão de CEHs [17], mas também é rico em pro-eritroblastos necessários ao metabolismo fetal e é o local de diferenciação mieloeritroide e linfóide B no feto [18].

Com a vascularização e preenchimento com tecido mesenquimal dos espaços do osso trabecular é formada a medula óssea (MO). As CEHs migraram do fígado fetal para a circulação o que permite a colonização do novo tecido por estas células. A retenção das CEHs na MO é feita nos nichos estaminais hematopoiéticos, que providenciam um

ambiente de preservação e regulação da atividade estaminal [19, 20].

Em condições de homeostase, as CEHs apresentam diferentes capacidades e atividades. Uma pequena proporção de CEHs está em circulação [21], outra fração está em processo de diferenciação, mas a vasta maioria destas células são mantidas como uma população celular quiescente com uma dimensão altamente regulada [22]. As atividades das CEHs são reguladas por um balanço de estímulos intrínsecos e sinais extrínsecos. Os fatores intrínsecos das CEHs, são a expressão autónoma de um programa genético estocástico, definido principalmente por fatores nucleares reguladores da transcrição genética e do ciclo celular. Os estímulos extrínsecos, são a resposta celular induzida por sinais exteriores recebidos pela célula na forma de fatores solúveis parácrinos, autócrinos e endócrinos [23, 24].

A regulação da atividade das CEHs é feita em dois tipos de nichos estaminais da MO diferenciados, o nicho endosteal e o nicho vascular, onde são estabelecidas as vias de sinalização celular com fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão [25], tal como esquematizado e resumido na figura 2.



**Figura 2 – Nichos estaminais hematopoiéticos da medula óssea.**

As CEHs quiescentes residem nos nichos do endóstio ósseo em interação próxima com osteoblastos (OB), osteoblastos especializados (SNO) e outras células do estroma da MO.

Fatores químicos como os níveis de  $Ca^{2+}$ , níveis hipóxicos de  $O_2$ , moléculas de adesão e quimiocinas especializadas mantêm e protegem a CEH quiescente. CEHs ativadas são mobilizadas para a proximidade das sinusoides vasculares onde interagem com as células endoteliais (CE), células perivasculares do estroma mesenquimais (CAR e CME-nestina+) e células neuronais. A homeostase das CEHs é mantida regulando a dimensão do compartimento por autorrenovação, mobilização ou apoptose celular através de fatores extrínsecos e intrínsecos. As CEHs migram no nicho através da interação da CXCL12 produzida pelas células do nicho e o CXCR4 das CEHs. São mantidas na superfície do endóstio através de interações celulares incluindo ligações homotípicas N-caderina (N-cad.) e osteopontina (OPN) e com o CD44 e/ou integrinas. O sinal produzido pela OPN causa uma diminuição da expressão de Jagged-1 ligando do Notch-1 nas CEHs e permite a interação dos Tie-2 com o Ang-1 e do c-Kit com o SCF e do c-Mpl com a trombopoietina (TPO) os primeiros presentes nas CEHs e os segundos nos osteoblastos. Estas interações suportam a quiescência das CEHs no nicho osteoblástico. No nicho vascular, as células endoteliais das sinusoides suportam, a proliferação e a diferenciação dos progenitores hematopoiético. Neste nicho há uma exposição à circulação sanguínea, logo a hormonas, citocinas, oxigénio e nutrientes que servem necessidades da proliferação e diferenciação das CEHs a uma linhagem celular. OB, osteoblastos; SNO, Osteoblastos com n-caderina fusiforme; OC, osteoclastos; CME, célula mesenquimal estaminal, CSNS, célula do sistema nervoso central simpático; CAR, célula reticular produtora de CXCL12. (Adaptado de Ehninger A. e Trumpp A., 2011, [26])

O primeiro nicho, o endosteal, é localizado na superfície do endóstio ósseo (também é denominado de nicho osteoblástico) e é sugerido como o local de armazenamento das CEHs quiescentes e regulação da dimensão da população destas células. O segundo nicho, o vascular, é localizado nos sinusoides endoteliais vasculares sendo apontado como o local e estrutura responsável pela regulação da autorrenovação e diferenciação das CEHs [26].

Há outras células envolvidas na homeostase dos nichos estaminais hematopoiéticos incluindo os monócitos e macrófagos. Estas células parecem regular a mobilização de CEHs para o sangue periférico e baço através da ativação de osteoclastos e diminuição da CXCL12 [27]. Inclusivamente, parecem estar envolvidas no mecanismo de mobilização de CEHs para o sangue periférico, induzido pelo fator de crescimento de granulócitos G-CSF (G-CSF, Granulocyte Colony-Stimulating Fator), [28] que constitui a base do principal método de colheita de CEHs para transplantação clínica [29].

### **1.2.2. Caracterização Funcional e Fenotípica das Células Estaminais Hematopoiéticas**

As CEHs e os progenitores hematopoiéticos foram inicialmente identificados em ratos irradiados submetidos a transplante de medula óssea. Till e McCulloch verificaram a formação de colónias celulares no baço dos animais tratados que denominaram de unidades de formação de colónias no baço (CFU-S, Colony Forming Unit-Spleen) [30]. Algumas colónias incluíam células, que transplantadas noutros animais irradiados, reconstituíam uma hematopoiese completa [31]. Estas células com capacidade

autorrenovação e diferenciação nas várias linhagens celulares hematopoiéticas permitiram estabelecer o carácter clonal da diferenciação hematopoiética com origem numa célula estaminal multipotente.

As CEHs são extremamente raras (estima-se uma frequência de 1 em  $3 \times 10^6$  células de MO humana) e indistintas morfológicamente [32]. Por outro lado, o reconhecimento fenotípico das CEHs humanas é um processo dificultado pela não expressão ou expressão muito baixa dos marcadores específicos de qualquer das linhagens hematopoiéticas maduras [33-35]. A marcação negativa com um painel de marcadores das linhagens eritroide, mieloide e linfóide justamente denominado de Lin (Lineage) associado à expressão diferencial de outros marcadores como o CD34 [36], CD38 [37], CD43 [38, 39], CD45RO/CD45RA [40], CD49f [41], CD59 [42], CD90/Thy-1 [35], CD109 [43], CD117/c-Kit [43], CD133[44, 45], CD166 e HLA-DR [46] têm sido propostos como forma de identificação destas células. É importante referir, que nenhum dos marcadores de superfície enunciados é completamente específico das células humanas com capacidade estaminal hematopoiética. O marcador CD34, uma sialomucina que atua como fator de adesão celular, é o marcador mais usado para estas células na medida em que virtualmente todas as células com potencial clonogénico *in vitro* residem no compartimento CD34<sup>+</sup> [36]. Estas células, no entanto, constituem uma população heterogénea que compreende as CEHs pluripotentes e também células multipotentes já comprometidas a uma linhagem [47].

Recentemente, a atividade estaminal hematopoiética humana foi resolvida ao nível do fenótipo único celular através da expressão de uma integrina, a CD49f [41]. A transplantação de células isoladas de sangue cordão umbilical (UCB) com o fenótipo composto Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>Rho<sup>dim</sup> possibilitou uma reconstituição imuno-hematopoiética multi-linhagem de longo-termo, extremamente eficiente, em ratos imunodeficientes [41]. Já a perda de expressão CD49f possibilitou enxertos transitórios, indicadores de células progenitoras multipotentes não autorrenováveis [41] (Figura 2).

O potencial terapêutico das CEHs depara, no entanto com algumas dificuldades, estas são células raras e a sua manipulação *ex vivo* tem vindo a revelar-se um processo muito difícil, o que prova uma dependência completa destas células pelo microambiente dos nichos estaminais da MO.

### 1.2.3. Os Progenitores Celulares e o Desenvolvimento das Linhagens Celulares Hematopoiéticas

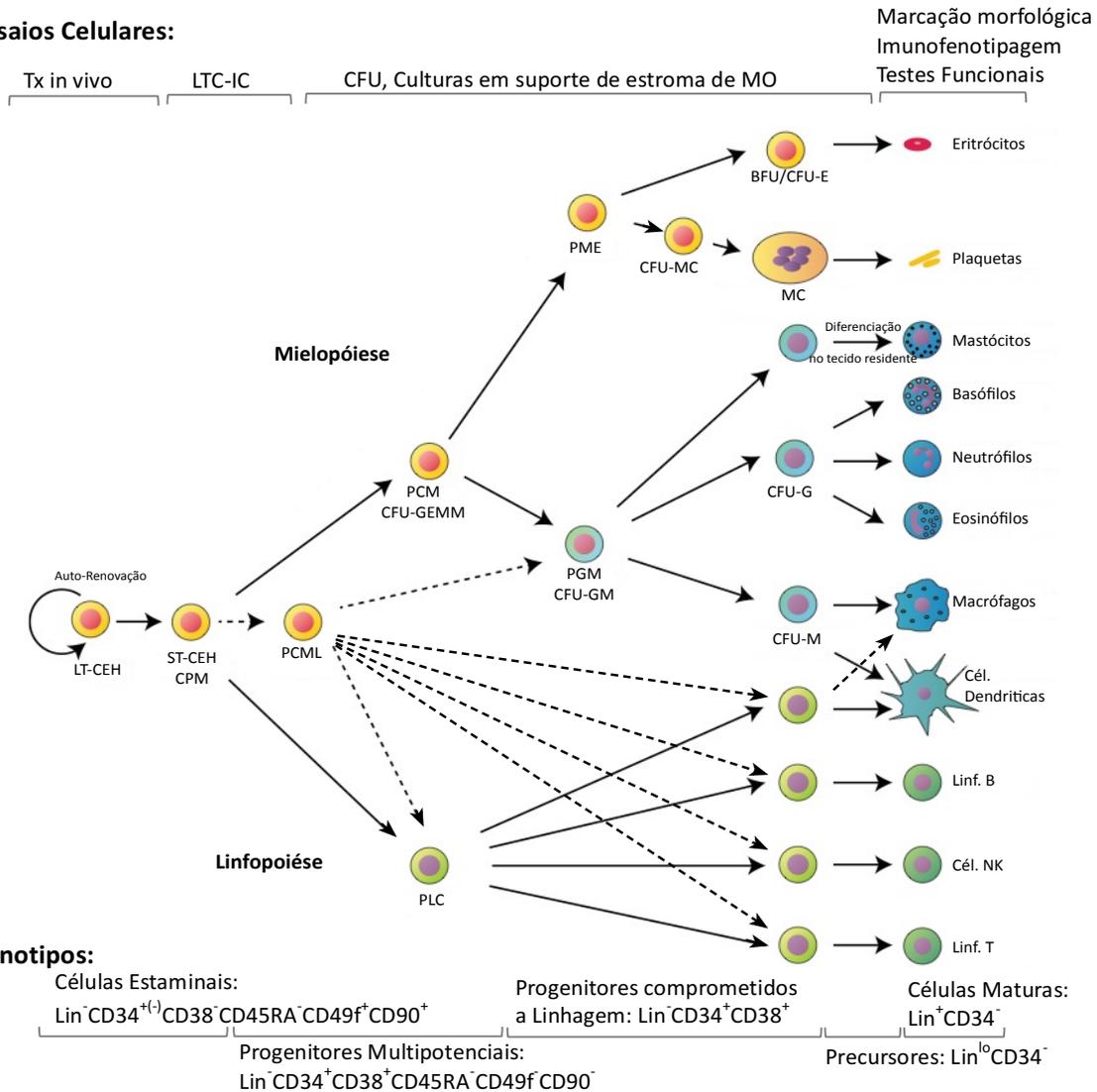
A hematopoiese inicia-se com a divisão celular das CEHs que originam os progenitores multipotentes (PMP) sem a capacidade estaminal de autorrenovação. O modelo clássico da hematopoiese pressupõe a diferenciação deste precursor multipotente nas células progenitoras comuns eritro-mieloides (PCEM) ou nos progenitores comuns linfoides (PCL). Este modelo reside na dicotomia entre uma linhagem linfóide e uma linhagem mielóide, em que a cada nível de diferenciação, as células ficam progressivamente mais restritas a um tipo celular; um processo denominado de 'comprometimento à linhagem'. Devido ao facto de os morfologistas celulares encontrarem na MO todos os precursores dos eritrócitos, plaquetas, granulócitos e monócitos; estas células passaram a constituir a linhagem mielóide. Neste modelo, as PCEM assumem dois tipos de diferenciação, a primeira origina os progenitores comuns eritróides-megacariocíticos (PCEMC) comprometidos com a formação das células não imunes do sangue, eritrócitos e plaquetas, a segunda forma os progenitores comuns granulócitos-monócitos (PCGM) capazes de gerar as células imunes granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), os monócitos e os macrófagos [48]. As células da linhagem linfóide são os linfócitos T e B que foram primeiro identificados na circulação linfática e depois tecidos linfóides como o baço, o timo e os gânglios.

A identificação de células progenitoras hematopoiéticas com capacidade de diferenciação em ambas as linhagens mielóide e linfóide, acrescentado da dificuldade da colocação das várias subpopulações de células dendríticas nos mapas hematopoiéticos, tem vindo a provocar alguma contestação em relação ao compromisso dicotómico assumido pelos progenitores multipotentes [49-52]. Desta forma, têm sido propostos modelos melhorados em relação às ramificações dos precursores mais indiferenciados que determinam as vias de maturação celular hematopoiética. O modelo da hematopoiese alternativo à dicotomia clássica é o modelo mielóide, que propõe que o potencial de diferenciação mielóide é retido até tarde por células capazes de diferenciação linfocitária [53].

A organização hierárquica mais atual da hematopoiese humana prevê que o comprometimento mielóide segue o modelo clássico em que o PCEMC perde desde logo o potencial linfóide, segregando-o para uma diferenciação dicotómica; uma com potencial mielóide, a outra com potencial eritroide, tal como já descrito, sob as formas celulares PCGM e PEM respetivamente. O primeiro progenitor segue as vias de diferenciação das espécies celulares mieloides granulocíticas e monocitárias,

enquanto o segundo manifesta o potencial de diferenciação eritroide e megacariocítico [54]. Por outro lado, o precursor linfoide PCML não apresenta um potencial linfoide restrito, na medida em que estas células são aptas a diferenciação em linfócitos T e B, células NK e células da linha mielo-monocitária (macrófagos e células dendríticas) [55].

**Ensaio Celulares:**



**Figura 3 Hierarquia da diferenciação hematopoiética.**

Representação esquemática das vias de diferenciação durante a hematopoiese. Estão representados os modelos atuais da hematopoiese clássica proposta por Weissman et al. (linhas contínuas) [56] e o modelo mieloide que prevê um progenitor comum que retém capacidade de diferenciação em células da linhagem mieloide e linfoide (PCML) (linhas tracejadas). A capacidade estaminal de autorrenovação é perdida assim que a CEH entra numa via de diferenciação. Os ensaios de transplantação in vivo permitem a identificação de células estaminais com a capacidade de repovoar os nichos estaminais da medula óssea. Os ensaios LTC-IC (Long-Term Culture-Initiating Cells) permitem a identificação em populações de células primitivas, das células estaminais e das células progenitoras, as primeiras têm capacidade de reconstituição hematopoiética de longo termo. Os ensaios CFU (Colony-Forming Units) identificam células progenitoras multipotenciais e progenitores comprometidos a uma linhagem. LT-CEH, Célula estaminal hematopoiética de longo termo; ST-CPM, Célula Progenitora Multipotente de Curto Termo; PCM, Progenitor Comum Mieloide; PGM, Progenitor PLC, Progenitor Linfoide Comum, CFU-GEMM, Unidade de formação de colónias –

Granulócito, Eritrócito, Macrófago, Megacariócito; BFU-E, Burst-Forming Unit Eritroide; CFU-E, Unidade de formação de colônias Eritroide, CFU-MC, Unidade de formação de colônias– Megacariócito; MC, Megacariócito; CFU-GM, Unidade de formação de colônias– Granulócito, Monócito; CFU-G, Unidade de formação de colônias– Granulócito; CFU-M, Unidade de formação de colônias– Macrófago. Os mastócitos são células hematopoiéticas da linhagem mieloide que fazem toda a maturação nos tecidos de residência. Em baixo, estão identificados os marcadores fenotípicos, mais frequentemente aceites na identificação e separação das várias populações de células estaminais e progenitores hematopoiéticas. Outros marcadores podem ser utilizados para definir entre subpopulações. (Esta figura utiliza informação de Wognum, A. e Szilvassy, S., 2013, [47] e Dzierzak, E. e Philipsen S. 2013, [57])

A figura 3 dispõe uma comparação da hierarquia das vias de diferenciação nos dois modelos prevalentes da hematopoiese humana. De qualquer forma, em qualquer um dos modelos sobressaem sempre duas linhas de ontogénese celular, a mielopoiese que inclui a eritropoiese e a trombopoiese, e a linfopoiese.



#### **1.2.4. O Desenvolvimento de Células Imunocompetentes**

##### **1.2.4.1. Os Granulócitos e as Células do Sistema Mononuclear Fagocítico derivados da Mielopoiese**

Os granulócitos constituem um grupo de células hematopoiéticas com uma grande diversidade funcional. A diferenciação desta linhagem celular resulta em três tipos de células circulantes, os neutrófilos, os eosinófilos, os basófilos e uma população de células não circulantes, os mastócitos. As células maduras apresentam uma morfologia muito clara, o núcleo tem uma forma multilobular ou segmentada e possuem um número elevado de vesículas de armazenamento no citoplasma, denominadas de grânulos; o que lhes confere os epónimos, de células polimorfonucleares ou granulócitos. Todos os granulócitos fazem parte da resposta imunológica inata, produzem proteases, mediadores inflamatórios e também outras moléculas com ação moduladora das células da imunidade adquirida.

A granulopoiese é a via de diferenciação hematopoiética mais ativa, em larga parte devido à necessidade de formação de neutrófilos, estimada num humano adulto em  $1-2 \times 10^{11}$  células por dia [58]. Estes são os leucócitos com a frequência mais levada no sangue (cerca de 45%), mas têm uma vida curta, estimada em uma média de 5 dias no sangue periférico [59]. Os neutrófilos são células com grande mobilidade que respondem a quimiocinas produzidas na inflamação. Fazem um controlo efetivo de agentes infecciosos bacterianos e fúngicos por fagocitose, por libertação de moléculas microbidas armazenadas nos grânulos e por retenção das bactérias em estruturas extracelulares de DNA (NETs – neutrophil extracellular traps) [60]. Os eosinófilos constituem cerca de 5% dos leucócitos totais, são ativados por citocinas produzidas por respostas do tipo Th2 (IL-5) e são extremamente eficientes na resposta a infeções por parasitas. Há uma população destas células residentes em tecidos como o gastrointestinal ou as glândulas mamárias. O tipo de granulócitos menos comum, os basófilos (0.5% dos leucócitos totais), são células não-fagocíticas que expressam o recetor de alta afinidade para a imunoglobulina E (IgE), e que ativados, libertam histamina pré-formada e mediadores inflamatórios como os leucotrienos e prostaglandinas [61]. Estas células possuem muitas semelhanças estruturais e funcionais com os mastócitos, com a diferença de que os basófilos são células circulantes enquanto os mastócitos fazem a sua diferenciação terminal, não na MO como todos os tipos celulares anteriores, mas sim nos tecidos onde permanecem como células residentes [61].

Os monócitos constituem outra linhagem celular mieloide derivada agora da

monopoiese e constituem cerca de 10% dos leucócitos circulantes [62]. São células com capacidade imunológica efetora, equipadas com recetores de quimiocinas e de moléculas de adesão que medeiam a migração da corrente sanguínea para os locais de inflamação [63], onde fazem o reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogénicos [64]. Da ativação subsequente, pode resultar uma diferenciação celular em macrófagos e/ou células dendríticas e a produção de mediadores e citocinas inflamatórias com capacidade moduladora da resposta imunológica inata e adaptativa [65].

Em relação aos monócitos circulantes, com base na expressão diferencial do CD14 (componente do recetor do lipopolissacarídeo LPS) e do CD16 (FcγRIII), são reconhecidas duas subpopulações celulares distintas. Os monócitos clássicos apresentam um fenótipo CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, enquanto uma população minoritária (±10%) apresenta a expressão de ambos os marcadores CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> [66]. As duas subpopulações expressam perfis de citocinas diferentes e um repertório de recetores de superfície distinto [62].

A diferenciação dos precursores dos monócitos e dos próprios monócitos dá origem a células especializadas ao ambiente de maturação. No entanto, todas estas células partilham uma propriedade comum, a capacidade fagocítica; e por isso constituem o sistema mononuclear fagocítico (SMF) [67]. Células tão diferentes como os osteoclastos no osso [68], os macrófagos alveolares no pulmão [69], as células de Kupffer no fígado [69] ou os microgliócitos do nervoso central [70] ilustram heterogeneidade da diferenciação terminal destas células que são genericamente denominadas de macrófagos.

A diferenciação das células mononucleares dá também origem às células dendríticas (DCs) [71]. As DCs constituem uma população heterogénea de células com a função principal de fazer a apresentação de antígenos (Ags) às células T (APCs, células apresentadoras de antígenos) e a modulação da resposta imunológica adaptativa. São células com a expressão de um repertório alargado de recetores de reconhecimento de Ags diversos, incluindo o HLA, o sistema CD1, recetores do tipo Toll (TLRs) e manose [72]. No sangue periférico são distinguidas duas linhagens principais: as células dendríticas mieloides (mDCs) e as células dendríticas plasmacitoides (pDCs) [73].

A população de mDCs é caracterizada pela expressão dos antígenos mieloides clássicos e é reconhecida uma fração principal com expressão de CD1c e uma fração minoritária (cerca de 10%) com expressão de CD141 [74]. As mDCs CD1c<sup>+</sup> estão presentes no sangue e nos tecidos linfoides e influenciam a polarização efetora das células T CD4<sup>+</sup> com o perfil de citocinas produzidas [75]. As mDCs CD141<sup>+</sup> são

também encontradas em tecidos não linfoides como a pele, o fígado ou os pulmões [76] e são especializadas na apresentação cruzada de Ags via MHC classe I a células T CD8<sup>+</sup> [77], na fagocitose de células mortas ou necróticas [78] e no reconhecimento de ácidos nucleicos via TLR-3 e TLR-8 [79].

A segunda linhagem, as pDCs, tipicamente não expressa antígenos mieloides mas expressa os marcadores linfoides CD45RA bem como uma proporção variável de CD2 e CD7 [74] e os marcadores específicos CD123, CD303 e CD304. Uma proporção destas apresenta vestígios de rearranjos somáticos dos *loci* genéticos do recetor de células T (TCR) e de Ig o que indica um desenvolvimento ontogénico mais ambíguo [80]. As pDCs são células com uma vida relativamente longa que estão presentes na MO e em todos os tecidos periféricos. Estas células são especializadas na resposta a infeções virais, detetando com recetores endossomais (TLR-7 e TLR-9) ligandos de ácidos nucleicos virais (RNA cadeia única e DNA CpG não metilado), produzindo em resposta, quantidades massivas de interferões do tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ); contudo são também competentes como células apresentadores de Ags e no controlo das respostas imunológicas mediadas por células T [81].

#### **1.2.4.2 A Linfopoiese, o Desenvolvimento e Regulação das Células Linfoides**

A linfopoiese ou linfocitopoiese é o termo usado para definir a formação e desenvolvimento das várias linhagens celulares linfocitárias, que tem início na MO, mas é terminado para algumas espécies celulares noutros tecidos linfoides encapsulados como o timo, o baço ou os gânglios linfáticos.

A linfopoiese dá origem três tipos principais de células, as células linfoides inatas, os linfócitos B e os linfócitos T.

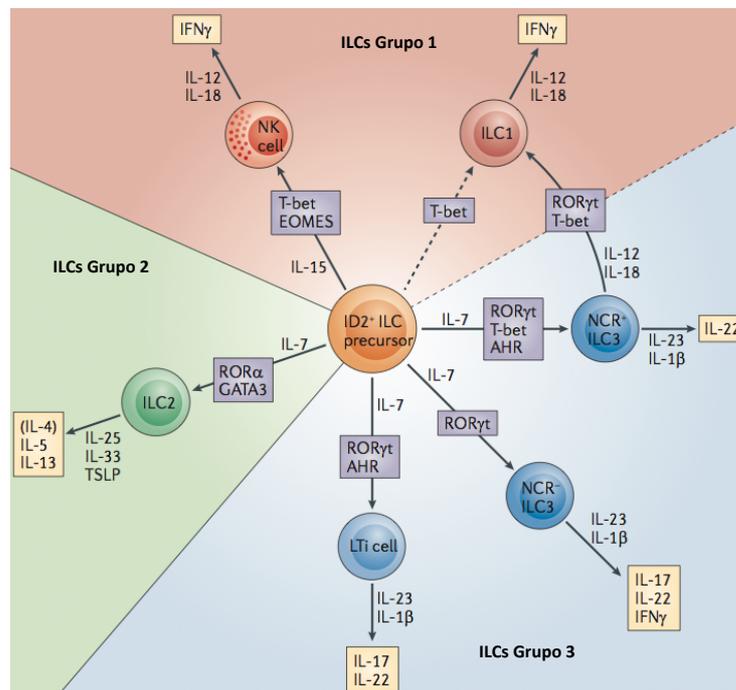
##### **1.2.4.2.1. As Células Linfoides Inatas ILCs e NK**

As células citotóxicas naturais (NK, natural killer) são os 'membros fundadores' de uma família de células hematopoiéticas que foi recentemente estabelecida. Estas células têm origem num progenitor linfoide comum e são denominadas de células linfoides inatas (ILCs) [82]. As ILCs caracterizam-se pela ausência de marcadores fenotípicos mieloides e por exibirem uma morfologia linfoide sem no entanto apresentarem os recetores de Ags-específicos, característicos dos linfócitos T e B, que são originados por rearranjo somático [83] e [84].

Com exceção das células NK, as ILCs são residentes em vários tecidos epiteliais como o intestino ou pulmões e vias aéreas, no fígado e tecidos linfoides [85]. Nestes

tecidos, são células com uma posição privilegiada na vigilância de infecções e controle de microrganismos comensais e que uma vez ativadas têm um importante papel efetor e imunomodulador, mas também têm um papel central na remodelação de tecidos [82].

Estão descritos três grupos de ILCs maduras, as ILC1, ILC2 e ILC3, caracterizadas por uma expressão divergente de fatores de transcrição e perfis funcionais distintos que se comparam aos perfis efetores das células T CD4+ 'helper' (Th). Apresentam em comum um desenvolvimento condicionado à expressão do repressor transcricional inibidor da ligação ao DNA 2 (ID2) e à cadeia  $\gamma$  do recetor comum de citocinas (IL-2R $\gamma$ , CD122) [82, 85] (Figura 5).



**Figura 5 – Modelo de classificação funcional das ILCs e regulação do seu desenvolvimento e diferenciação.**

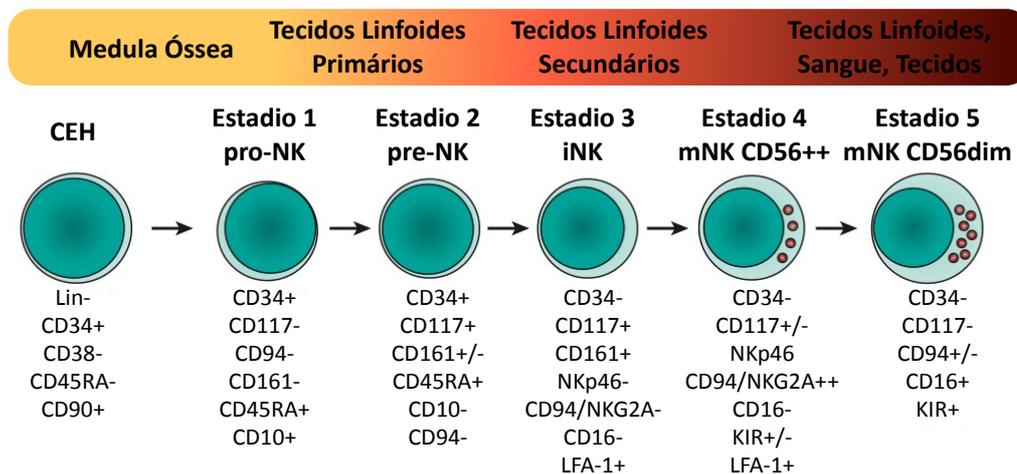
No modelo de desenvolvimento das ILCs que prevalece, é proposto que todas as ILCs surjam da diferenciação de uma célula precursora comum com potencial linfóide, que, no entanto, não está identificada, pelo que são possíveis outras trajetórias. À semelhança do desenvolvimento das células NK, este precursor é comprometido à diferenciação ILC pela expressão do ID2. O desenvolvimento e diferenciação das ILCs depende da expressão da IL-2R $\gamma$  (CD122, que constitui uma componente dos recetores IL-2R, IL-7R, IL-9R, IL-15R e IL-21R). As células NK exigem o estímulo pela IL-15, as outras ILCs são dependentes da estimulação pela IL-7. Para além das citocinas, a diferenciação das ILCs nas diferentes subpopulações é ainda regulada por vários fatores de transcrição. As células NK são dependentes da expressão do fator T-box específico de células T (Tbet) e da eomesodermina (EOMES). Não estão elucidados os requisitos de desenvolvimento das ILC1, mas uma proporção destas células tem origem na diferenciação das ILC3 positivas para o recetor natural de citotoxicidade (NCR) que aumentam a expressão de Tbet e diminuem a expressão de recetor- $\gamma$  órfão relacionado ao recetor do ácido retinoico (ROR $\gamma$ t). As ILC2 dependem dos fatores de transcrição GATA-3 e do recetor- $\alpha$  órfão relacionado ao recetor do ácido retinoico (ROR $\alpha$ ). Já as ILC3 exigem o fator ROR $\gamma$ t quer para o seu desenvolvimento quer função. A manutenção das subpopulações NCR+ILC3e células indutoras de tecido linfóide (LTi) dependem do recetor aril hidrocarbono (AHR). As ILC1

e ILC3 produzem as suas citocinas após estimulação com IL-12 e IL-23, respetivamente, atuando as citocinas da família da IL-1 (IL-1 $\beta$  e IL-18) como um co-estímulo importante. As citocinas IL-25, IL-33 e a linfopoietina estromal timica (TSLP) são os estímulos de ativação da ILC2 com produção das suas citocinas específicas. (Figura adaptada de Spits H. et al, 2013, [82]).

As células NK são as ILCs circulantes, constituem 5-10% dos linfócitos do sangue e encontram-se também com relativa abundância na MO, no fígado, no útero, no baço e em menor frequência, no tecido linfoide secundário e no timo. São células com a capacidade de reconhecimento da transformação celular devido à infeção com vírus ou malignidade e em resposta produzem citocinas (em particular IFN- $\gamma$ ) e uma variedade de quimiocinas que recrutam APCs e promovem a diferenciação de linfócitos T CD4+ em células efetoras do tipo Th1. Por outro lado, têm uma capacidade natural de produzir e dirigir mediadores citotóxicos e apoptóticos (perforinas, granzimas e Fas ligando) contra células alteradas mediante mecanismos MHC independentes e outros dependentes de anticorpos [86].

As células NK desenvolvem-se a partir de um progenitor linfoide comum (PLC) num processo contínuo de diferenciação feito na MO e nos vários tecidos linfoides periféricos até à maturação de células NK funcionalmente distintas [83], (figura 6).

O processo é regulado inicialmente por fatores de transcrição específicos indutores do comprometimento à diferenciação NK [87] e depois pela aquisição do recetor IL-15R, que ativado, promove a maturação funcional e a sobrevivência das células NK [88].



**Figura 6 – Representação esquemática dos percursos celulares no desenvolvimento das células NK.**

O desenvolvimento das células NK desde as células pluripotenciais até às células maduras é proposto como um modelo linear de diferenciação em que as células passam por cinco estádios de maturação e diferenciação que tem provavelmente início na MO. Os intermediários celulares com potencial de diferenciação NK estão também presentes em vários tecidos, e são particularmente abundantes nos linfoides como o timo e gânglios, mas também surgem no sangue, no fígado e até no útero. No processo de diferenciação, as células vão transitando por vários fenótipos de superfície e adquirindo propriedades funcionais, até uma diferenciação terminal que se caracteriza pela expressão baixa de CD56 e a expressão de CD16 e dos

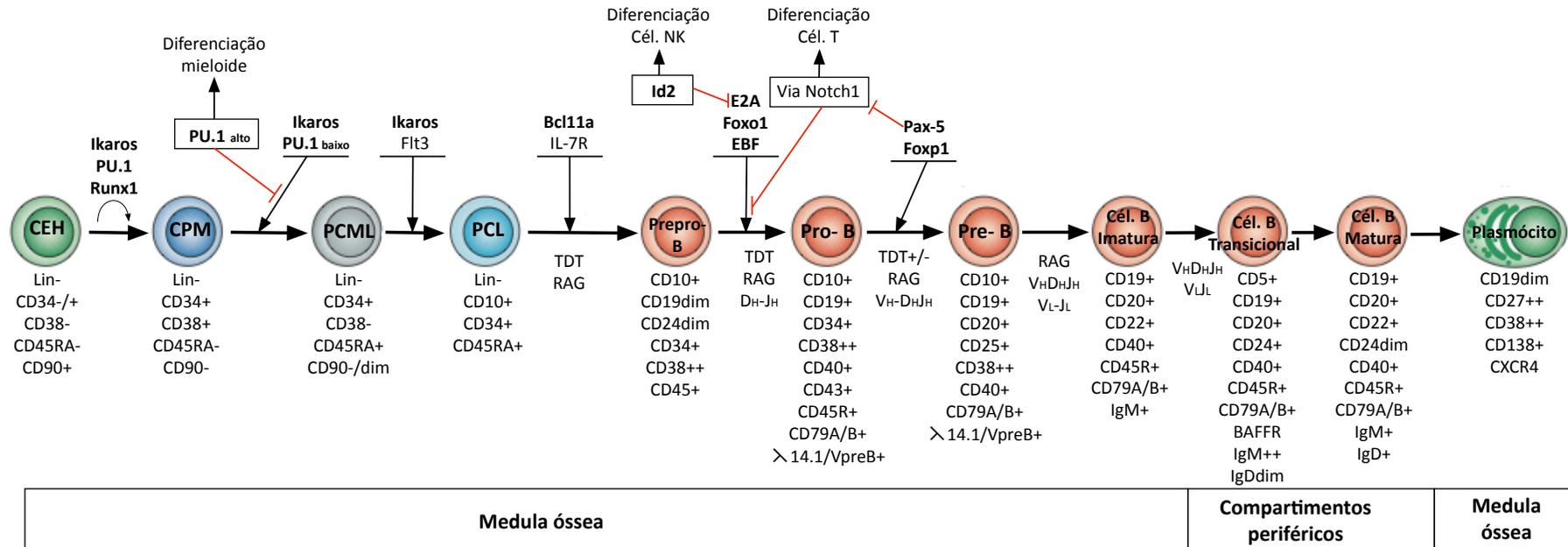
recetores KIR e CD94 bem como dos grânulos citotóxicos. CEH, célula estaminal hematopoiética, pro-NK progenitor linfoide NK; pre-NK, precursor celular NK; iNK, célula NK imatura; mNK, célula NK madura. (Adaptado de Yu, J., 2013, [89]; complementado com informação de Caligiuri, M., 2008, [90]).

Durante o processo de maturação as células NK adquirem os seus recetores funcionais de forma progressiva. O primeiro recetor a surgir é o CD161 e de seguida o CD56, seguidos do dímero CD94/NKG2A, do NKp46, do NKG2D e finalmente, na fase final de maturação, os recetores NK da família da Igs (KIRs) e do recetor de Igs FcγRIII (CD16) [83]. Com base na expressão diferencial do CD56 e do CD16, são facilmente reconhecidas no sangue periférico pelo menos 4 populações de células NK, com diferentes maturações e perfis funcionais [90-93]. As células NK mais imaturas apresentam uma expressão forte de CD56 e uma ausência ou uma expressão reduzida de CD16 (CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-/+</sup>) [94]. As células NK CD56<sup>++</sup> são predominantes nos tecidos linfoides secundários, têm excelentes capacidades proliferativas, migratórias e de produção de citocinas imunoreguladoras; no entanto, apresentam uma capacidade citotóxica reduzida. No sangue periférico predominam as células NK com expressão baixa de CD56 e expressão de CD16 (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) (constituem até cerca de 90% do *pool* celular). Estas células apresentam um potencial proliferativo limitado e expressam um repertório maturo de recetores inibitórios e de ativação, incluindo os KIR, que regulam a citotoxicidade celular mediada por Ags e direta mediada por grânulos [90]. Adicionalmente, foi reconhecida uma população de células NK, que tem sido pouco caracterizada, com um fenótipo CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> [95]. Uma acumulação destas células têm sido reportada em situações de infeção viral crónica e constituem provavelmente uma população de células NK terminalmente diferenciadas hiporespondedoras [93, 95, 96].

Há evidências que apontam para que uma fração ou todas as células NK CD56<sup>++</sup> sejam as precursoras das CD56<sup>dim</sup>. As primeiras células apresentam telómeros maiores, são particularmente frequentes nos tecidos neonatais e constituem primeira população de células NK a reconstituir após o transplante de células estaminais hematopoiéticas [83, 97].

#### **1.2.4.2.2. O Desenvolvimento dos Linfócitos B**

Os linfócitos B são os efetores do braço humoral da imunidade adquirida. A característica mais diferenciadora deste tipo de linfócitos é a expressão à superfície celular do recetor de células B (BCR), uma molécula de imunoglobulina com uma porção transmembranar que liga Ags [98].



**Figura 7 – Caracterização dos estádios de desenvolvimento da linfopoiese B e fatores reguladores da diferenciação.**

As células B são geradas a partir de células estaminais hematopoiéticas (CEHs) que expressam os fatores de transcrição Runx1, Ikaros e Pu.1, o primeiro de manutenção e sobrevivência, os segundos como fatores instrutores da diferenciação hematopoiética. O balanço dos níveis de PU.1/Ikaros especificam a diferenciação da célula progenitora multipotente, o PU.1 elevado induz a diferenciação mieloide, a atividade elevada do Ikaros traduz-se na expressão no progenitor comum mielolinfoide (PCML) do recetor Flt3, especificando a diferenciação linfoide. A expressão do recetor da IL-7 (IL-7R) demarca o progenitor linfoide comum (PCL). O conjunto de sinais traduzidos por estes recetores e a expressão do fator Bcl11a resulta na expressão dos genes linfoides de recombinação somática RAG e TDT. A especificação da diferenciação linfoide B ocorre com a célula prepro-B, que inicia o rearranjo da cadeia pesada das Igs  $D_H-J_H$  e expressa níveis baixos de CD19. O compromisso de diferenciação linfoide B resulta da atividade dos fatores E2A, EBF, Foxo1, Pax-5 e Foxp1, que encerram as pontes de diferenciação para outras linhagens linfoides ao induzir a expressão de genes B como o  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  (CD79A/B) e o rearranjo genético e expressão ordenada primeiro da cadeia pesada das Igs expresso como pré-recetor de células B ao associar-se às cadeias  $V_{preB}$   $\lambda$ 5 e depois das cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  de que resulta a expressão do BCR IgM na célula B imatura. Estas células emergem da medula óssea para a circulação de forma a fazerem uma maturação antigénio dirigida nos tecidos linfoides e a diferenciação final nas células produtoras de anticorpos, os plasmócitos que expressam o recetor CXCR4 para uma colonização definitiva da medula óssea mediada pelo CXCL12. (Adaptado de Nagasawa T., 2006 [99], complementado com informação de LeBien T., 2000 [100]; Fuxa M et al, 2007 [101]; Nutt et al, 2007 [102] e Mandel E. et al, 2010, [103]).

A principal função destas células é a produção de imunoglobulinas glicolizadas solúveis também conhecidas como anticorpos (Acs) contra os Ags reconhecidos pelo BCR. A aquisição desta funcionalidade, e em particular da capacidade de produção de Acs de alta afinidade para Ags específicos, deve-se a uma cooperação destas células com APCs e células T [104].

As células B têm a capacidade de capturar Ags por endocitose mediada pelo BCR, que são processados internamente e apresentados pela via do MHC classe II a células T CD4+. Estas últimas células, induzem a ativação, proliferação e diferenciação das células B em plasmócitos produtores de Acs e células B de memória [105].

O desenvolvimento das células B a partir do compartimento de CEHs tem sido extensivamente estudado e permitiu caracterizar a programação genética estabelecida por uma rede de fatores de transcrição, que especifica o comprometimento à linhagem linfocitária B, mas também o processo de rearranjo dos genes das imunoglobulinas (Igs) que é fundamental para a diversidade do repertório de reconhecimento apresentados pelos anticorpos. Este processo apresenta vários estádios de desenvolvimento celular que é realizado primeiro na MO, depois nos órgãos linfoides periféricos até à diferenciação terminal em plasmócitos residentes na MO e outros tecidos, tal como sumarizado na figura 7.

O processo é estabelecido com a expressão das proteínas de ativação da recombinação 1 e 2 (RAG 1 e RAG2) com uma atividade dirigida primeiro à recombinação dos genes da cadeia pesada das imunoglobulinas IGH [101], cujo rearranjo produtivo é verificado [106] e depois, também de forma sequencial, aos genes IGK e IGL das cadeias leves [107].

Deste processo, resulta um precursor pré-B que procede ao emparelhamento de uma cadeia leve  $\kappa$  ou  $\lambda$  com uma IGH $\mu$  formando um BCR funcional e tornando-se uma célula B imatura.

A especificidade deste recetor é selecionada e as células que formaram recetores autoreativos são sujeitas a três destinos possíveis. As células com um BCR com alta afinidade por autoAgs morrem por apoptose (seleção negativa) [108], as que reconhecem pequenos péptidos solúveis próprios tornam-se anérgicas não respondendo a estímulos de proliferação e maturação [109]. Já algumas células autoreativas prosseguem ao fazerem uma edição do recetor. De facto, foram capazes de proceder a um novo rearranjo dos genes das Igs com sucesso e são recuperadas para o repertório final celular. Estas células baixam a expressão de IgM de superfície e mantêm a atividade RAG que prossegue o rearranjo das cadeias leves Ig disponíveis. Se resultar um rearranjo produtivo que forme um BCR não autoreativo, as células

prosseguem a maturação normal [110, 111]. As células imaturas selecionadas prosseguem uma via de maturação fora da MO, emergem para a circulação sanguínea como células B transicionais e migram para os tecidos linfoides periféricos. As células B transicionais sofrem vários processos de seleção e de maturação para células B capazes de responder especificamente a um Ag, as células B naives maduras [112]. A diversidade do repertório periférico e a maturação terminal das células B será discutida na secção 2.3.

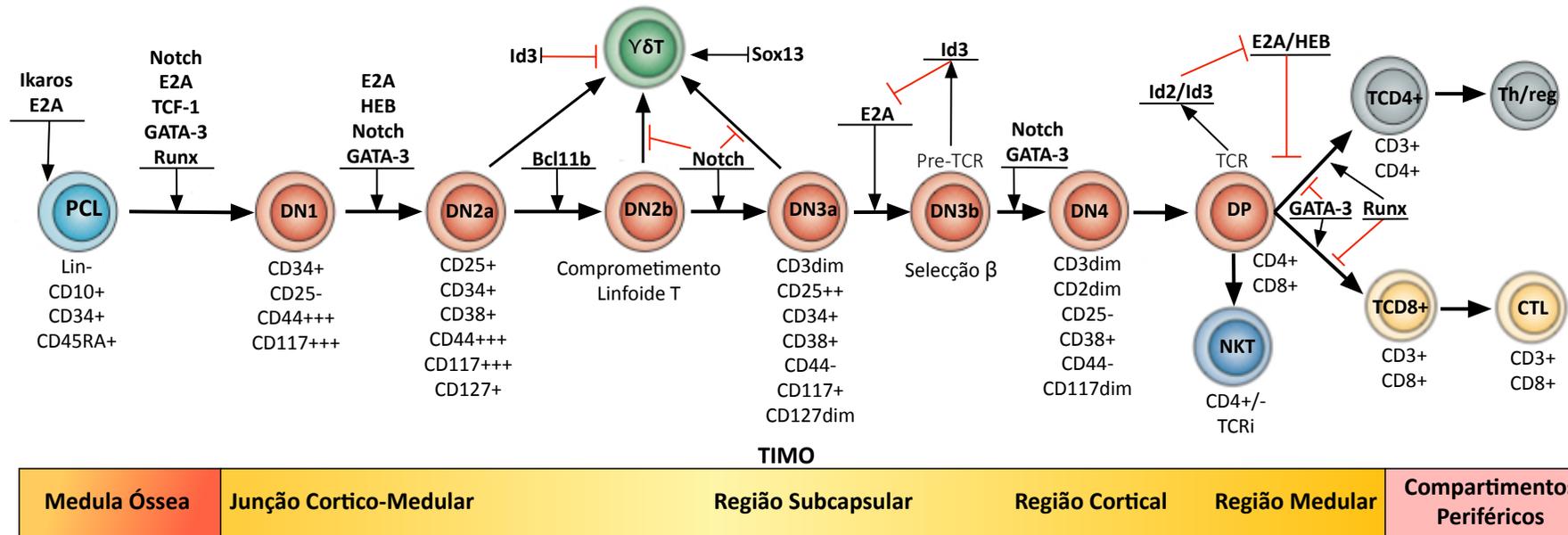
#### **1.2.4.2.3. O Desenvolvimento dos Linfócitos T**

Os linfócitos T ou células T distinguem-se das outras células hematopoiéticas por um grande potencial proliferativo, uma longevidade extensa e uma capacidade de diferenciação terminal especializada [113]. Em conjunto com as células B constituem o braço adaptativo e reativo da imunidade. Expressam recetores clonais de superfície, os TCR (T Cell Receptors), gerados por recombinação do DNA germinal que determinam o reconhecimento de Ags específicos, e também, os precursores celulares que têm sucesso no processo de maturação.

O desenvolvimento das células T envolve múltiplos estádios de diferenciação e proliferação celular que são sumarizados na figura 8. O processo é iniciado na MO, tem continuidade no timo, onde as células assumem o comprometimento às linhagens linfocitárias T, e termina nos tecidos linfoides secundários onde é feita a diferenciação terminal.

Os progenitores CPL determinados para diferenciação linfoide são mobilizados da MO via circulação sanguínea para o timo, um tecido linfoide especializado no desenvolvimento e formação do repertório das várias linhagens de linfócitos T [114]. A especificidade do timo no desenvolvimento das células T deve-se à expressão específica pelo estroma dos ligandos da via Notch [115]. Esta via de sinalização induz a cada célula pré-T ou timócito, um de dois programas de desenvolvimento, de que resultam duas frações celulares: uma que expressa um TCR $\gamma\delta$  e apresenta uma baixa capacidade proliferativa e outra fração faz o rearranjo genético sequencial cadeia  $\beta$  depois da cadeia  $\alpha$  do TCR e tem uma elevada capacidade proliferativa [116].

As células com o TCR $\gamma\delta$ , normalmente são negativas para os coreceptores CD4 e CD8 e constituem uma população celular especializada na imunovigilância e imunoregulação dos tecidos epiteliais [117]. Uma pequena população de células T com TCR $\alpha\beta$  restrito apresenta características das células T e NK e é especializada no reconhecimento de Ags lipídicos.



**Figura 8 – Estádios do desenvolvimento da linfopoiese T e sinais moleculares reguladores da diferenciação celular.**

Os progenitores determinados para o desenvolvimento linfocitário, PCL, surgem na MO por diferenciação das CEHs regulada pelos fatores das famílias Ikaros e E2A e migram para o timo. No timo é ativada a via Notch que leva à expressão dos fatores de diferenciação T GATA-3 TCF-1 e outros. Neste processo é terminado primeiro o potencial de diferenciação mieloide residual e linfocitário B resultando numa célula dupla negativa CD4 e CD8 (DN). Os timócitos DN entram num processo de desenvolvimento definidos como estádios DN1 a DN4 com base expressão diferencial CD4, CD8, CD25, CD44 e CD117. O comprometimento irreversível à diferenciação T é feito na transição do estádio DN2a (CD117+++), para o DN2b (CD117+) como resultado da atividade do fator Bcl11b. No estádio DN3 é feito rearranjo V(D)J dos loci TCRγ, δ e β. A atividade do fator Sox13 promove a diferenciação Tγδ e os fatores da família E a expressão da cadeia β. O Id3 funciona como regulador promovendo a exclusão alélica neste loci. As células que procedem na via αβ expressam um pre-TCR composto por uma cadeia β funcional e uma cadeia substituta pre-TCRα e são selecionadas para a diferenciação DN4 iniciando a recombinação do locus TCRα. Os timócitos iniciam a expressão dos coreceptores CD8 e depois CD4 (células DP) e sofrem um processo de seleção de forma a minimizar a autoreatividade. As células sobreviventes emergem na circulação periférica como os vários tipos celulares das linhagens linfocitárias T: NKT se expressam o TCR invariante, ou células T citotóxicas CD8+ (CTLs) ou T auxiliares CD4+ (Th) disponíveis para a polarização das repostas imunológicas e sua regulação (Treg). (Adaptado de Miyazaki K., 2014 [118], complementado com informação de Rothenberg E., 2005[113] e Germain R., 2002 [119]).

A maioria das células T emergentes do timo tem um TCR $\alpha\beta$  e expressam CD4 ou CD8 constituindo as linhagens T reguladora CD4<sup>+</sup> e T citotóxica CD8<sup>+</sup> respetivamente.

O desenvolvimento dos timócitos está associado uma realocação dinâmica destas células no parênquima tímico [120]. Esta movimentação celular pelas células com diferenciação mais avançada, é muito provavelmente, uma forma a procurar a interação dos TCR recém-formados com moléculas MHC das células do timo associadas a péptidos próprios. A afinidade desta interação constitui um sinal de sobrevivência (seleção positiva) ou deleção (seleção negativa) para as células recém-formadas [121, 122]. As células que formaram um TCR com uma baixa avidéz pelo complexo MHC-Ag sofrem uma apoptose retardada por receberem uma sinalização de sobrevivência fraca. As células que recebem uma sinalização muito forte do TCR, por apresentarem uma afinidade muito forte por ligandos próprios, morrem por apoptose aguda. A sinalização com uma intensidade intermédia, que certifique que o TCR da célula em avaliação reconhece com especificidade o sistema de apresentação, mas não possui uma afinidade elevada pelo Ag próprio, potencialmente indutora de autoreatividade, garante a sobrevivência da célula para continuar a diferenciação linfocitária T – seleção positiva [123].

Durante a seleção positiva, os timócitos DP com um TCR que reconhecem o complexo MHC classe I–Ag diferenciam-se em células T CD8<sup>+</sup> enquanto os que reconhecem o complexo MHC classe II–Ag diferenciam-se em células T CD4<sup>+</sup> [124]; sendo este um processo também regulado por fatores intrínsecos. As células selecionadas são realocadas à medula do timo onde, assume-se, passam um período até serem definitivamente exportadas do timo [125]. Durante este período, há dois processos dependentes das células do estroma da medula do timo fundamentais para o estabelecimento da tolerância central imunológica: uma segunda fase de deleção de clones com TCR autoreativo e a formação da população de células T reguladoras (Treg) [126].

No primeiro processo, os timócitos medulares CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são sujeitos a uma segunda seleção do repertório TCR. Esta seleção adicional é particularmente importante para estabelecer a tolerância central aos Ags tecidulares e é feita por dois mecanismos que se completam. O primeiro tem como base a apresentação promíscua de Ags que representam o próprio, por células epiteliais da medula do timo (mTEC) [127], devido à atividade do fator transcricional regulador autoimune (AIRE) [128]. A título de exemplo, devido a este fator, as mTEC conseguem expressar Ags de genes normalmente só ativos em células muito especializadas, como o da insulina produzido apenas pelas células  $\beta$  dos ilhéus do pâncreas [129]. O segundo mecanismo usa DCs como APCs de Ags próprios que podem ter duas origens, DCs geradas no timo que

capturam Ags da apoptose de mTECs [130] e DCs periféricas que são recrutadas para a medula tímica e contribuem para a apresentação de Ags periféricos e deleção dos timócitos imaturos autoreativos [131]. O segundo processo, a produção das Treg contribui não só para o estabelecimento da tolerância mas também para a homeostase imunológica [132]. As Treg são diferenciadas a partir de timócitos imaturos CD4<sup>+</sup>, um processo proposto como dependente da produção de uma citocina, a linfopietina do estroma tímico (TSLP), por células de uma estrutura da medula do timo, os corpúsculos de Hassall [133]. A TSLP atua sobre as DCs do timo [133] para a seleção de timócitos CD4<sup>+</sup> com um TCR de alta afinidade [134]. As Treg completam uma diferenciação dependente da expressão do fator Foxp3 e proliferam a partir de sinais derivados do IL-2R CD25 [135].

A exportação das diversas linhagens de timócitos maduros, do parênquima do timo é feita através do espaço perivascular que é canalizado para circulação externa. As células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> emergem como células T emigradas recentes do timo (RTE) naives e imaturas, mas preparadas para reconhecer Ags cognatos do seu TCR através das APCs, tornando-se células ativadas. A geração da diversidade estrutural dos repertórios clonotípicos de linfócitos e a sua diferenciação terminal será discutida na secção 1.3.

### **1.3. A Diversidade Estrutural e a Diferenciação Funcional dos Repertórios Linfocitários**

#### **1.3.1. A Diversidade e Maturação das Células NK**

##### **1.3.1.1. Os Repertórios de Recetores NKG2, NCR e o Complexo de Recetores KIR**

As células NK desenvolveram um sistema de reconhecimento do próprio alterado, baseado na afinidade de um repertório de recetores de superfície por moléculas do próprio, proteínas celulares induzidas por stress biológico e moléculas de agentes patogénicos [136]. A atividade efetora das células NK é determinada por um balanço delicado de sinais de ativação e inibição, traduzidos por estes recetores, após a ligação dos seus ligandos específicos [137]. Através desta regulação, as células NK medeiam processos imunológicos diversos que incluem, o combate à infeção, a tumores, a tolerância materno-fetal e a resposta alogénica [138].

O sistema de recetores do tipo C-lectina NKG2 é composto por cinco variantes, NKG2A, B, C, E e H associados num heterodímero à cadeia invariante CD94. Uma sexta variante é o homodímero NKG2D associado ao adaptador de transdução de sinal DAP10 [139]. O sistema NKG2/CD94 reconhece como ligandos as moléculas HLA-E [140] sendo as variantes 2A e B inibitórias e as restantes ativadoras das células NK [141]. O complexo NKG2D reconhece as moléculas de stress MICA/B, conduzindo também um sinal de ativação celular [139].

Um segundo sistema de recetores das células NK, os NCRs é composto por moléculas da superfamília da Igs, com três variantes NKp30, NKp44 e NKp46 que com o reconhecimento de ligandos próprios alterados e outras, conduzem uma ativação rápida da atividade efetora das células NK [137, 142].

O sistema de recetores das células NK maduras KIR (Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors), é codificado por um grupo de quinze genes mapeados em 19q13.4 que, em conjunto com dois pseudogenes, constituem um *cluster* genético de cerca de 150 kilobases (kb) no complexo dos recetores leucocitários. Estes recetores têm sido classificados em quatro grupos principais KIR2DS, 3DS, 2DL e 3DL, com base no número de domínios do tipo Ig extracelulares (2 ou 3) e na funcionalidade das regiões citoplasmáticas. Os recetores com domínios citoplasmáticos longos (L) apresentam motivos inibitórios ITIM, os recetores com regiões intracelulares curtas (S) apresentam um aminoácido (aa) com carga na região transmembranar que permite a associação ao DAP-12 traduzindo um sinal de ativação através dos domínios ITAMs deste

adaptador [136]. A exceção às regras anteriores é o KIR2DL4 que apresenta o aa transmembranar e um motivo ITIM. Este recetor parece associar-se ao FcεRI-γ que induz um sinal estimulatório à célula pelo seu ITAM [143] mas também pode induzir um sinal inibitório através do seu ITIM.

Os diferentes recetores KIR reconhecem grupos específicos de alelos dos *loci* A, B, C e G do HLA com base numa afinidade interativa com motivos moleculares do polimorfismo alélico destes genes (tabela 1).

As células NK não destroem as células que apresentam uma expressão HLA normal, pois os recetores inibitórios apresentam uma maior afinidade pelo ligando e, os sinais induzidos por estes são dominantes sobre os sinais ativadores. Já as células cuja expressão MHC classe I apresente alterações ou deficiências de expressão, são alvo das células NK ativadas, pois não receberam um sinal inibitório dos KIR devido à ausência do ligando (modelo do 'missing self') [144].

**Tabela 1 – Recetores humanos KIR e os seus ligandos.**

<i>KIR</i>	<i>Ligando</i>	<i>Motivo Reconhecido</i>
<b>2DL1, 2DS1</b>	HLA-C grupo 2 (C*02,*04,*05,*06)	domínio α1 Lisina 80
<b>2DL2, 2DL3, (2DS2?)</b>	HLA-C grupo 1 (C*01,*03,*07,*09)	domínio α1 asparagina 80
<b>3DL1, (3DS1?)</b>	HLA-B, A*23,*24,*32	motivo Bw4 (aa 77-83 do domínio α1). A forma Bw4 com Isoleucina 80 apresenta uma interação com o recetor KIR com maior afinidade em relação a Bw4 Treonina 80
<b>3DL2</b>	HLA-A	reconhecimento específico dos alotipos A3 e A11
<b>2DL4</b>	HLA-G	
<b>2DS4</b>	HLA-C	reconhecimento específico do alotipo Cw4
<b>2DL5, 3DL3, 2DS3, 2DS4, 2DS5</b>	?	

(Adaptado de Bashova A. et al, 2006 [136])

Este papel das células NK tem sido explorado no transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas, onde se tenta potenciar o efeito antitumoral NK, com mismatches HLA classe I dirigidos ao repertório KIR das células do enxerto [145-147].

Uma componente importante da diversidade dos recetores KIR é o conteúdo diferente de genes que cada haplótipo pode conter [148]. Com base na frequência a nível populacional, o conteúdo de genes KIR pode ser classificado em dois haplótipos principais, o haplótipo A e haplótipo B. Os haplótipos KIR têm uma estrutura estabelecida pelos seguintes genes conservados: o 3DL3 presente na extremidade centromérica, o 3DP1 e 2DL4 ao centro do haplótipo e o 3DL2 na extremidade telomérica que termina o haplótipo [149].

Estes 'genes estrutura' estabelecem duas regiões com um conteúdo genético variável, uma na região centromérica do locus KIR, outra na região telomérica. Em ambas estas

regiões existem duas alternativas de conteúdos de genes KIR qualitativamente diferentes denominadas de Cen-A, Cen-B, Tel-A e Tel-B (Figura 9).

Hap.	Cen.	Tel.	Região Centromérica								Região Telomérica						
			3DL3	2DS2	2DL2/3	2DL5B	2DS3/5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1/S1	2DL5A	2DS3/5	2DS1	2DS4	3DL2
A	Cen-A	Tel-A			2DL3					R							
B	Cen-B	Tel-B		2DS2	2DL2					C							
	Cen-B	Tel-B		2DS2	2DL2					C							
	Cen-B	Tel-A		2DS2	2DL2					C							
	Cen-A	Tel-B			2DL3					R							

**Figura 9 – Organização genômica e diversidade do conteúdo genético do locus KIR humano.**

O conteúdo genético dos haplótipos KIR mais comuns é representado esquematicamente. As caixas cinzentas escuras indicam a presença do respetivo gene no haplótipo; o KIR2DS2, 2DL2 e 2DL3 estão especificados de forma a realçar a ligação entre 2DS2 e 2DL3 e as formas alélicas do 2DL1. Hap. designa o haplótipo completo que na cor rosa indica os segmentos que constituem o haplótipo A e na cor azul os segmentos do haplótipo B. Cen. e Tel. designam os segmentos genéticos do haplótipo no sentido centromérico e telomérico respetivamente. (Figura de Moesta A. et al, 2012 [150])

A combinação do Cen-A com o Tel-A forma o haplótipo A, que apresenta um baixo conteúdo de genes, predominantemente KIR inibitórios que reconhecem o HLA classe I. As três outras combinações Cen-B com Tel-B, Cen-B com Tel-A e Cen-A com Tel-B são coletivamente denominados de haplótipo B [150].

### 1.3.1.2. A Diferenciação Terminal das Células NK

A diferenciação terminal das células NK está associada a uma mudança progressiva do fenótipo celular relacionado às funções efetoras. O compartimento periférico destas células, como já foi referido, é dominado por duas subpopulações com uma expressão diferencial do CD56, as células CD56<sup>++</sup> e CD56<sup>dim</sup>. As células NK CD56<sup>dim</sup> deverão surgir da maturação das primeiras e passam por um processo de educação que compreende a expressão dos genes KIR.

A complexidade da regulação da expressão genética dos KIR começa a ser compreendida. O ponto inicial para o estabelecimento do modelo atualmente aceite foi o reconhecimento de que do processo resulta um repertório de células NK que ao nível individual não expressa o conteúdo germinal completo de genes KIR, mas sim, uma combinação estocástica de um ou vários genes. devido um controlo epigenético da sua expressão [151, 152]. Foi sugerido que há uma demetilação aleatória de sequências do *cluster* de genes KIR num estadio precoce da diferenciação NK, que é preservada nas gerações celulares subseqüentes até à maturação, o que resulta num perfil de expressão destes genes semelhante a uma seleção clonal [153]. Por outro lado, os genes KIR apresentam promotores bidirecionais [154] altamente homólogos

nas regiões intergênicas, que são ativados de uma forma competitiva quer no sentido *sense* quer *anti-sense* [155]. Desta forma, as células têm a capacidade de fazer uma expressão variegada dos genes KIR [156], isto é, diferentes células NK expressam diferentes genes ou grupos de genes KIR do repertório germinal o que contribui para a considerável diversidade fenotípica da população de células NK.

O primeiro recetor inibitório expresso pelas células CD56<sup>++</sup> é o CD94/NKG2A que reconhece o complexo estabelecido por péptidos líder do HLA classe I apresentado pelo HLA-E que têm uma expressão celular ubíqua [146]. Desta forma, é garantida a tolerância das células NK a uma expressão normal do MHC classe I [157]. Subsequentemente é diminuída a expressão CD56, aumentada a expressão CD16 e CD57 e iniciada a transcrição nos locus KIR. As células verificam se o(s) recetor(es) KIR expresso(s) encontra(m) um ligando do próprio MHC classe I. Se não é encontrado, as células mantêm a expressão de CD94/NKG2A como recetor tolerante ao próprio [158]; se é encontrado um ligando, a expressão CD94/NKG2A é inibida, as células usam os KIR como recetores do próprio e adquirem capacidades citotóxicas aumentadas [89]. Este processo, em que as células em desenvolvimento são influenciadas pelos sinais que recebem é chamado de educação das células NK [159, 160].

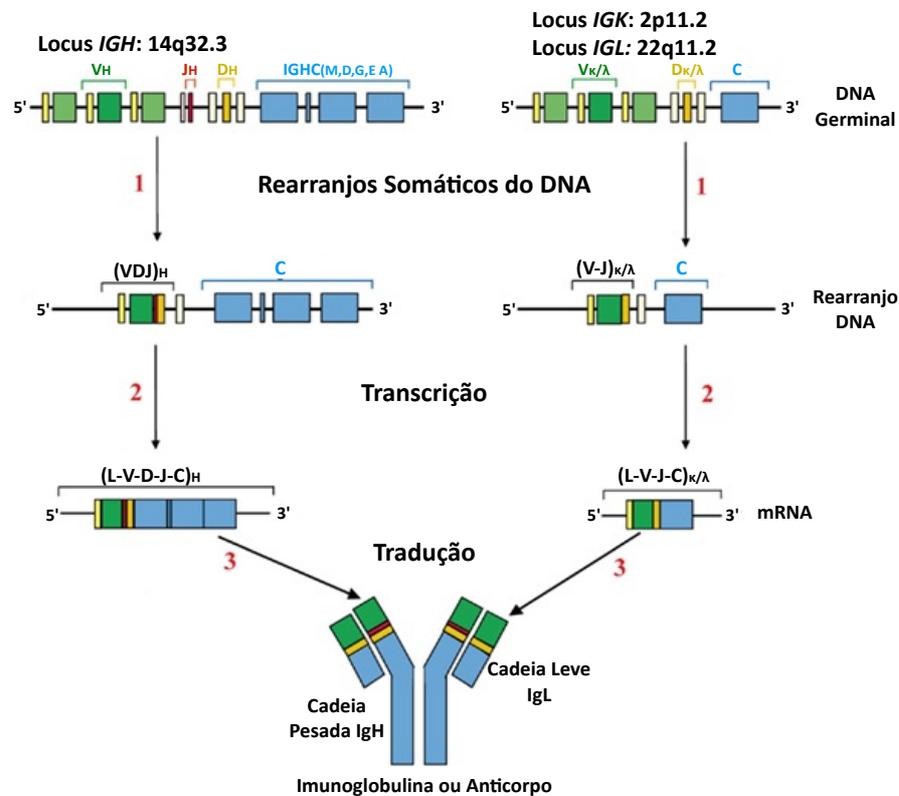
A existência de memória imunológica pelas células NK tem sido amplamente discutida. As melhores evidências para uma diferenciação terminal das células NK com capacidade de resposta dirigida, vêm dos estudos que provam a expansão e persistência de uma subpopulação NK, durante a infecção com citomegalovirus humano (HCMV) [161]. Estas células expressam o recetor de ativação NKG2C, KIR e CD57+ e parecem apresentar capacidades efetoras intensificadas durante a infecção [161, 162]. No entanto, são ainda precisas mais evidências que clarifiquem e caracterizem uma diferenciação e especialização funcional das células NK no sentido da memória imunológica.

### **1.3.2. O Repertório de Linfócitos B**

#### **1.3.2.1. Os Rearranjos Somático dos Genes *IGH*, *IGK* e *IGL***

Na ontogenia das células B, verifica-se desde o início o rearranjo ordenado dos *loci* *IGH*, *IGK* e *IGL* que codificam as cadeias pesadas e leves das Igs (Figura 10). Estes genes, em contraste com os outros genes clássicos, não possuem um primeiro exão codificante funcional. Possuem múltiplos elementos no DNA germinal organizados como grupos de segmentos variáveis (V), de diversidade (D) (presente só no gene *IGH*), de junção (J) e uma região constante (C).

No genoma germinal, o locus *IGH* localizado na extremidade telomérica do cromossoma 14, na banda 14q32.3, é constituído por 76-84 sequências segmentares funcionais organizadas nos grupos V,D,J e C que definem a diversidade potencial da região variável da cadeia pesada e constituem repertório IGH. O grupo *IGHV* é constituído por 38-46 segmentos que por homologia (75% de nucleótidos homólogos) são organizados em seis famílias ou subgrupos *IGHV1- IGHV6*, o grupo *IGHD* é constituído 23 segmentos e o grupo *IGHJ* por 6 segmentos [163]. Os grupos *IGHC* são 9 (*IGHM*, *IGHD*, *IGHG1-4*, *IGHA1-2* e *IGHE*), ocupam uma região mais centromérica em relação aos outros, e codificam as regiões constantes da cadeia pesada das diferentes classes Ig - IgM,D,G, A e E [164].



**Figura 10 – Representação esquemática da organização genômica e do rearranjo somático dos loci *IGH*, *IGK* e *IGL*.**

No genoma germinal o locus *IGH* é constituído pelos grupos de elementos segmentares VDJ e C. A formação de um gene funcional envolve uma recombinação ordenada J-D<sub>H</sub> seguida de V<sub>H</sub>-J-D<sub>H</sub> pela seleção de um segmento de cada grupo e excisão do DNA somático dos segmentos não usados. Esta parte do gene codifica a região variável da IGH. A região constante é codificada pelo grupo *IGHC*. Células B imaturas e naives usam obrigatoriamente o *IGHM* ou *IGHD* para formar o BCR, células B maduras que fizeram as reações nos centros germinativos têm a capacidade de selecionar os segmentos constantes para as outras classes de Igs. O RNA mensageiro maduro *IGH* é constituído pela associação destes elementos incluindo uma sequência líder que possibilita a transcrição e a condução do péptido ao retículo endoplasmático. Os locus da cadeia pesada *IGK* e *IGL* fazem uma recombinação ordenada primeiro dos alelos *IGK* e depois em caso de falha deste dos alelos *IGL* selecionando um segmento V e J dos respectivos grupos. A transcrição e tradução origina a cadeia leve que é associada à cadeia pesada formando as Igs expressas como BCR ou Acs. (Figura adaptada de Giudicelli V. et al, 2012 [165])

Um primeiro exão funcional do gene *IGH* é estabelecido através da junção de um segmento  $V_H$ , de um  $D_H$  e de um  $J_H$  [166]. Este processo é iniciado em ambos os genes *IGH* das células precursoras prepro-B, que através da atividade recombinase mediada pelas RAG, faz a junção de um segmento  $J_H$  com um  $D_H$  resultando uma sequência  $J D_H$  [167]. O rearranjo completo  $V_H-D J_H$  é iniciado nas células pré-B, é iniciado num alelo e se não resultar um gene funcional, isto é, uma sequência com uma grelha de leitura, o outro alelo faz então a mesma recombinação [168, 169].

A formação de um exão  $V D J_H$  leva à transcrição de um RNA processado de forma a ficar com o segmento *IGHM* (figura 10)

Da tradução, resulta uma cadeia pesada  $I G H \mu$  expressa como pre-BCR. Tal como já referido, o pre-BCR sinaliza o sucesso da recombinação do gene da cadeia pesada Ig pela célula e induz o rearranjo de um gene da cadeia leve.

Os *loci* das cadeias leves *IGK* e *IGL*, fazem um rearranjo V-J para formar o primeiro exão do gene funcional que codifica a região variável da cadeia leve IGLs (Figura 11). O locus *IGK* está mapeado em 2p11.2, o grupo  $V_k$  contém 76 segmentos e o grupo  $J_k$  5 segmentos, que podem ser usados para formar um exão  $V J_k$ . O locus *IGL* está localizado em 22q11.2, possui 56 segmentos  $V_\lambda$  e três *clusters* J-C funcionais usados para formar os rearranjos  $V_\lambda-J_\lambda$  [170]. O processo, tal como o da cadeia pesada, é ordenado e sujeito a uma intensa regulação por fatores regulam a acessibilidade das moléculas de recombinação às sequências de DNA destes genes [171]. Primeiro o rearranjo é feito num alelo *IGK*, se este se revelar não funcional é induzida a recombinação do segundo alelo. A recombinação dos alelos *IGL* é induzida se todas as possibilidades de formar um gene *IGK* funcional falharem.

A formação de um alelo produtivo da cadeia leve conduz à expressão de IgL que associadas às IgH formam o BCR das células B imaturas. Tal como já referido, as células que apresentam um BCR autoreativo entram em apoptose, anergia ou se lhe for possível, procedem a uma edição do BCR através de um novo rearranjo somático. As células que têm possibilidade de fazer um novo rearranjo primeiro têm de apagar do genoma o alelo que codifica a proteína autoreativa. Este mecanismo é feito sobre os alelos *IGK* através de dois tipos de recombinações. O primeiro é feito fazendo um rearranjo do  $V J_k$  formado até ao elemento de deleção Kappa ( $K_{de}$ ) localizado a jusante, silenciando definitivamente o alelo ao eliminar o elemento  $C_k$ . A segunda forma, elimina também este elemento, mas fazendo um rearranjo desde uma sequência sinalizadora de recombinação (RSS, Recombination Signal Sequence) intrónica próxima do  $C_k$  até ao elemento  $K_{de}$  [172].

Durante os rearranjos são induzidas quebras na cadeia dupla de DNA pelo heterocomplexo dimérico RAG1/2 que reconhecem as sequências nucleotídicas RSS

[173]. As RSS são sequências de 7 e 9 pares de nucleótidos (heptâmero e nonâmero, respectivamente) altamente conservados e localizados em 3' de cada segmento V, 5' de cada segmento J e em ambos os flancos de cada segmento D. Uma sequência espaçadora de 12 ou 23 pares de bases não conservadas separam o heptâmero do nonâmero. Os segmentos dos genes a combinar, um apresenta um RSS com um espaçador de 12 bases, o outro é flanqueado por um RSS de 23 bases (regra conhecida por 12-23) [174]. Desta forma, os segmentos são rearranjados através de voltas invertidas que alinham as RSSs. O complexo RAG justapõe os dois segmentos, hidrolisa a ligação fosfodiéster entre as RSSs e os segmentos codificantes e usa os grupos 3'OH formados para uma transesterificação das cadeias opostas formando 'ganchos' que encerram as cadeias que contêm os segmentos [175]. A cadeia de DNA intermédia com os RSS em cada extremo é unida como um círculo de DNA constituindo o produto excisado (estes são os círculos de DNA com os sinais de junção que são quantificados como sjKRECS ou sjTRECS e permitem estimar a linfopoiese B e timopoiese, respectivamente [176, 177]). Nos extremos de cada cadeia com os segmentos codificantes, associa-se o complexo constituído pelas proteínas Ku70 e Ku80 [178] que promovem um processo que reúne as cadeias denominado de junção de terminais de DNA não homólogos (NHEJ, non-homologous end joining) [179]. O complexo Ku recruta uma proteína cinase dependente de DNA (DNA-PKcs) [178] e a proteína Artemis [180] que clivam o gancho das cadeias preferencialmente nas bases terminais ou a 1-2 bases em 5' das bases terminais. Nesta última clivagem assimétrica forma-se uma cauda 3' e são adicionados à cadeia 5' nucleótidos palindrômicos [181]. Para além destas bases suplementares adicionadas aos segmentos, é gerada diversidade genética suplementar no gene *IGH* e nos *loci TCR* removendo bases pela ação de exonucleases ou pela adição aleatória de N-nucleótidos pela ação da deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) expressa especificamente pelos precursores de células B e T [182]. Finalmente, o heterodímero Ku recruta um complexo constituído por XRCC4, DNA ligase IV e o fator Cernunnos (XLF), que estabelece as ligações moleculares entre nucleótidos dos dois segmentos codificantes [179, 183, 184]. Deste processo, resultam sequências genéticas únicas que, se estiverem em grelha de leitura, codificam a cadeia Ig e constituem o repertório estrutural primário de células B.

#### **1.3.2.2. A Maturação Terminal das Células B Induzida pelas Respostas aos Antígenos**

As células B recém-formadas emergem da MO para a circulação como células B

imaturas transicionais. Estas células são vistas como o elo de ligação entre o repertório imaturo de células B imaturas formado na MO e o repertório maturo de células B. O compartimento das células transicional é alvo de um processo de seleção periférico, de forma a eliminar o potencial autoreativo que permaneceu após a seleção na MO. A população de células B maduras deriva do compartimento transicional selecionado, que foi sujeito a um desenvolvimento nos compartimentos foliculares do tecido linfóide e na zona marginal do baço, em grande parte, com base na especificidade por Ags e intensidade do sinal do BCR [185].

A população de células B transicionais é heterógena, na medida em que estas células estão num contínuo desenvolvimento. O compartimento de células transicionais apresenta o fenótipo comum  $CD19^+CD20^+CD5^+IgM^{++}IgD^{dim}$  em que são distinguíveis três estádios de desenvolvimento. O mais imaturo é o T1 que compreende a fração de células recentemente emigradas da MO com a expressão  $CD24^{+++}CD38^{+++}$ . Estas células têm uma capacidade proliferativa muito baixa e são altamente sensíveis a estímulos apoptóticos. O segundo estádio é o T2 constituído pela fração precursora, com expressão  $CD24^{++}CD38^{++}$ , mais resistente à apoptose, que faz a migração para os tecidos linfóides periféricos. O terceiro é o estádio T3, com o fenótipo  $CD24^+CD38^{++}$ , que constitui o estádio de desenvolvimento prematuro naïve [186, 187]. De acordo com o modelo corrente para o desenvolvimento da maturação terminal das células B, as células T1 autoreativas são eliminadas devido à intensidade do sinal BCR produzido com estes Ags (seleção negativa). As células que ultrapassaram este processo de seleção fazem o desenvolvimento para células maduras naïves e tornam-se resistentes à apoptose, desta vez, através de um processo de seleção positiva dos sinais do BCR [188]. Este processo é regulado a dois níveis, o primeiro é inerente à natureza do BCR que as células formaram, o segundo é devido à sinalização através do eixo Baff-BaffR (Baff, fator de ativação de células B). O sinal induzido pelo Baff promove a sobrevivência e desenvolvimento das células transicionais em células maduras naïves, servindo também de determinante da longevidade das células B maduras [189].

As células naïves têm um fenótipo  $CD19^+CD20^+IgM^+IgD^+$  e vão colonizar duas estruturas dos tecidos linfóides: as zonas marginais (MZ) em especial do baço [190] e as regiões foliculares [191].

A MZ do baço é um tecido altamente perfundido e rico em células do SMF, o que o torna uma interface privilegiada entre a circulação sanguínea e o sistema imunológico [192]. Os Ags e patogénicos são capturados pelos macrófagos, DCs e neutrófilos, processados e apresentados às células B da MZ. As células B naïve com um BCR de afinidade fraca por Ags próprios são selecionadas a ativação e diferenciação B MZ

rápida [193]. O BCR das células MZ é sujeito a um grau relativamente baixo de edição por hipermutação somática (HSM), e na forma finalizada, apresenta características polireativas, na medida em que pode ligar múltiplos padrões moleculares microbianos [190]. As células B MZ são principalmente produtoras de IgM, mas algumas células fazem recombinação para mudança de classe de Igs (CSR) e produzem IgG e IgA [194]. Estas células encontram-se principalmente na interface de vários tecidos linfoides com a circulação, onde vigiam infecções bacterianas, nomeadamente por espécies encapsuladas; contra as quais desenvolvem uma resposta efetora, mediada por anticorpos poliespecíficos. As células B MZ encontram-se também em circulação e são caracterizadas como linfócitos B com o fenótipo  $CD1c^+CD21^{++}CD23^-CD27^+IgM^{++}IgD^{dim}$  [190].

O desenvolvimento folicular das células B apresenta duas características radicalmente diferentes do processo anterior. Primeiro, é feito através de uma reação imune num centro germinativo (GC) dependente da apresentação de Ags, de sinais co-estimulatórios do microambiente e por outras células presentes [195, 196]. Em segundo lugar, as células B que resultam deste processo expressam um BCR de elevada afinidade, normalmente monoreativo contra Ags de natureza proteica [190]. O processo é iniciado pela passagem das células B naïve, ativadas por um Ag cognato, na zona das células T das estruturas linfoides secundárias (principalmente gânglios). Entre as células T presentes nesta região, existe uma população T  $CD4^+$ , previamente diferenciada por DCs, que é aqui residente. Expressam  $CXCR5+CCR7^-$  e o fator  $Bcl6$  e são reconhecidas como células T foliculares de ajuda ( $T_{FH}$ ) [197]. A passagem da célula B naïve no contexto descrito, permite um reconhecimento cognato entre péptido Ag presente no MHC classe II da célula B e o TCR das  $T_{FH}$ . Este contato celular inicia uma rede de sinais co-estimulatórios por recetores e ligandos, de que se destacam os eixos  $CD40-CD40L$  e  $ICOSL-ICOS$  (ICOS, co-estimulador induzível de células T). A tradução destes sinais induz a sobrevivência das células B e a migração das duas células para a região folicular B, onde formam uma estrutura conhecida como centro germinativo [198]. As células B, agora conhecidas como centroblastos, procedem a uma intensa proliferação clonal [191]. Por outro lado, a reação imune do GC induz a produção de fatores como a IL-21 e o  $Bcl6$ , que promovem dois processos moleculares diferentes nos genes das Igs, mas mediados pela mesma enzima, a citidina deaminase induzida por ativação (AID) [199, 200]. A AID promove a hipermutação somática (HSR) das regiões variáveis dos genes das cadeias leves e pesadas das Igs. Desta forma é induzida diversidade adicional a estes genes [199]. Numa fase posterior, a AID atua especificamente sobre o gene *IGH* e promove uma recombinação especificamente dirigida à região *IGHC*. Este processo, conhecido

como recombinação de mudança de classe de Ig (CSR), produz rearranjos genéticos que fazem a seleção dos segmentos constantes que codificam as classes de IgG, A e E [201].

A reação imune do GC é ainda dependente de um terceiro tipo de células, as DCs foliculares (FDC) com origem no estroma do tecido linfoide. Estas células apresentam imunocomplexos de Ags aos centroblastos e induzem sinais de sobrevivência somente às células que apresentam um BCR com alta afinidade pelo Ag. Este processo, conhecido por maturação por afinidade, seleciona os clones celulares com BCRs editados por HSM com a mais alta afinidade pelo Ag [202]. As células selecionadas, conhecidas como centrócitos, reúnem então duas capacidades fundamentais para a resposta imunológica mediada por anticorpos: primeiro, de submeter o gene *IGH* ao processo de CSR de forma a produzir as classes de Ig que não a IgM e IgD e segundo, as Igs que produzem têm uma alta afinidade pelo Ag.

Os centrócitos terminam a expressão do fator Bcl6 por repressão pelo fator IRF4 e prosseguem por duas vias de diferenciação; em células de memória ou plasmablastos. O processo desta diferenciação não está completamente caracterizado, no entanto, sabe-se que a inativação do repressor transcricional PAX5 e o aumento do fator proteína indutora da maturação de linfócitos B 1 (Blimp1), são meios essenciais à diferenciação dos plasmablastos. Já a continuação da atividade do PAX 5 e sinais pelo recetor CD40 e pela IL-4 estão associadas à diferenciação em células de memória [191].

No sangue periférico, as populações de células B de memória são associadas à expressão do CD27. De facto, são as células CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> que apresentam as regiões variáveis dos genes das Igs com as mutações somáticas do processo SHM, o que constitui uma marca de diferenciação terminal. Estas células constituem no total cerca de 40% das células B circulantes [203] e têm a capacidade de fazer uma proliferação e diferenciação rápida, para plasmócitos produtores de Acs, quando encontram um Ag cognato [204]. Com base na expressão da Ig de superfície são reconhecidas várias subpopulações de células B de memória: as células CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> são propostas como as células de memória que resultam do desenvolvimento T independente como as MZ ou as B1-like [205] ; as células CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> são propostas como células de memória com origem na primeira fase da reação GC que podem ainda fazer a mudança de classe de Ig [206, 207]; as células CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> e CD27<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> constituem as populações de células de memória com origem na reação GC que fizeram o processo de CSR para as respetivas classe de Ig que expressam [208]. As células B de memória constituem uma memória reativa, na medida em que numa estimulação antigénica secundária, estas células proliferam e diferenciam-se em plasmócitos

produtores de Acs [209].

Os plasmablastos apresentam o fenótipo  $CD19^+CD20^-CD27^{++}CD38^{++}$  e constituem os precursores em trânsito para os locais de residência onde fazem a diferenciação terminal nas células produtoras de Acs, os plasmócitos [210]. Os locais de residência dos plasmablastos são definidos pelos recetores de quimiocinas que expressam e por um padrão de integrinas nos tecidos [211]. Por exemplo, os plasmablastos que expressam CCR10 (CCR, recetor de quimiocina com motivo CC) são conduzidos por gradientes de CCL28 (CCL, quimiocina ligando com motivo CC) para as mucosas, onde fazem a diferenciação em plasmócitos produtores normalmente de IgA. Os plasmablastos que expressam CXCR4 são sensíveis aos níveis levados de CXCL12 na MO, onde se estabelecem num nicho celular estabelecido pelas células do estroma da MO. Aqui recebem suporte por moléculas de adesão, sinais de diferenciação terminal e de viabilidade [212]. Um marcador de diferenciação dos plasmócitos é a expressão de CD138 [213]; na MO é mantida uma população de plasmócitos de vida prolongada, produtores de quantidades massivas de IgG, IgA e IgE secretada na forma de Acs, fundamentais para a manutenção da memória imunológica. Os plasmócitos com vida longa produzem níveis constantes de Acs circulantes e constituem a memória humoral protetora [209].

### 1.3.3. A Diversidade Estrutural e Funcional dos Linfócitos T

A imunidade mediada pelos linfócitos T é um elemento central da resposta imunológica celular adaptativa. A capacidade adaptativa das células T é dependente de um repertório celular diverso e complexo. O repertório de células T surge como:

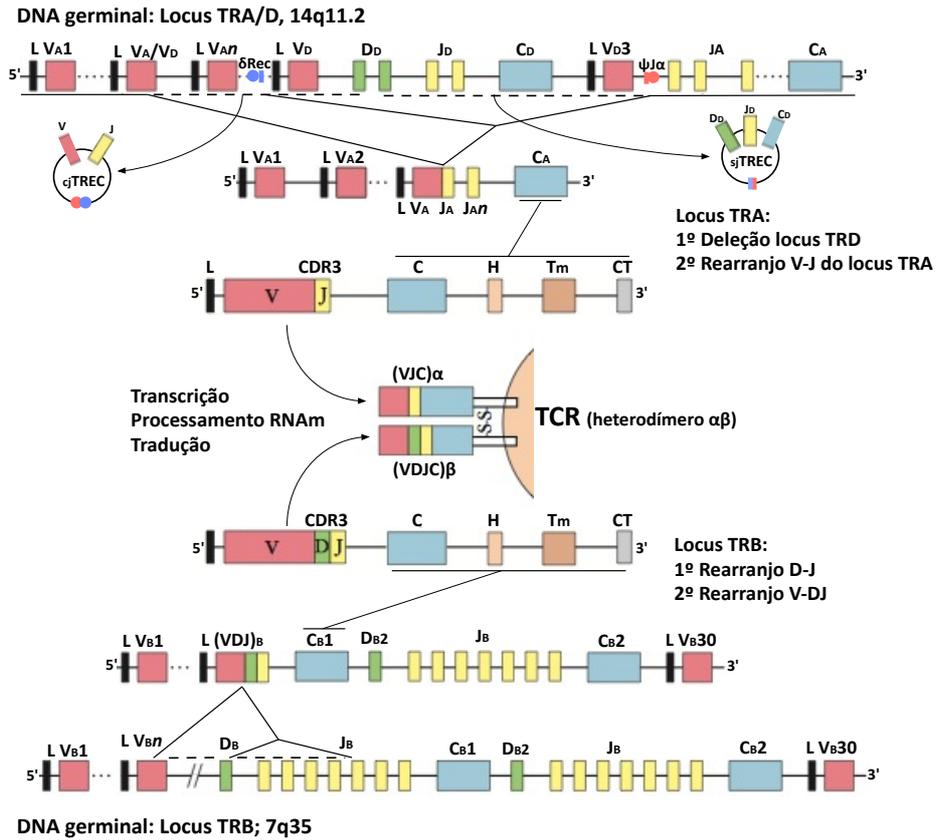
- diferentes linhagens celulares  $T\alpha\beta$  e  $T\gamma\delta$  com recetores TCR clonotípicos Ag específicos derivados de recombinação somática,
- subpopulações celulares, como a  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , com funcionalidades que se complementam,
- células da mesma linhagem e subpopulação que, expressando até o mesmo TCR, fazem processos de diferenciação/maturação diferentes, adquirindo também funções efetoras diferentes.
- a capacidade de diferenciar populações de células de memória, que num contato posterior com um Ag cognato, restabelecem rapidamente uma resposta efetora.

### 1.3.3.1. Os Loci do TCR, a Organização e Geração da Diversidade Estrutural

O TCR é um recetor heterodimérico de duas cadeias polipeptídicas ligadas por uma ponte dissulfídica, expresso especificamente pelos linfócitos T. As células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressam um TCR muito variável, constituído por uma cadeia  $\alpha$  associada a uma  $\beta$ . Uma população minoritária de linfócitos T expressa um TCR menos variável, composto por uma cadeia  $\gamma$  e uma  $\delta$ . Estas proteínas são o produto da expressão de 4 locus genéticos presentes em dois cromossomas. As cadeias  $\alpha$  e  $\delta$  são codificados pelos genes *TRA* e *TRD* localizados no cromossoma 14, em 14q11.2. A cadeia  $\beta$  é codificada pelo gene *TRB* localizado em 7q35 enquanto a  $\gamma$  é um produto do gene *TRG* presente no outro braço do cromossoma 7, em 7p15-p14 [214]. À semelhança dos genes que codificam as Igs, estes genes são constituídos por grupos de segmentos V(D)J separados no DNA germinal e portanto não funcionais [215].

O locus *TRB* prolonga-se por 620 kb e o repertório potencial é constituído por 40-48 segmentos *TRBV* associáveis por homologia em 23 famílias ou grupos *TRBV1* a *TRBV24* (o *TRBV10* é um pseudogene). Com a exceção do segmento *TRVB30* que está em orientação inversa e a jusante do grupo *TRBC2*, que, portanto, encerra em 3' o locus *TRB*, todos os outros grupos estão a montante 5' no sentido centromérico de um *cluster* D-J-C duplicado (Figura 12). A primeira parte do *cluster* contém seis grupos *TRBJ*, um *TRBD* e um *TRBC1*, a segunda parte contém oito *TRBJ*, um *TRBD* e um *TRBC2*. Todos estes grupos contribuem para formar o repertório da cadeia  $\beta$  do TCR [214, 216].

Durante o desenvolvimento tímico, os segmentos V(D)J que constituem os diferentes genes são reunidos num processo de junção somática combinatória (Figura 11). Os mecanismos moleculares de recombinação com deleção das sequências intermédias de DNA, mediados pelas RAGs e a junção de cadeias por NEHJ, tal como descrito na recombinação dos genes das Igs, são usados para formar os genes funcionais do TCR. Assim como no rearranjo *IGH*, também nos 4 loci TCRs, é adicionada diversidade genética adicional juncional, através da adição de P-nucleótidos e N-nucleótidos. Existe uma ordem cronológica para o rearranjo dos vários genes que codificam as cadeias do TCR, que é estabelecida pela regulação do acesso das RAG às várias sequências dos genes, por fatores do complexo E. O primeiro rearranjo é feito pelo locus *TRD*, seguido do *TRG*, se estes falham, as células procedem ao rearranjo *TRB* e por último do *TRA* [216].



**Figura 11 – Organização genômica dos loci *TRA*, *TRD* e *TRB* e rearranjos somáticos combinatórios V(D)J para a expressão do TCR $\alpha\beta$ .**

No genoma germinal o locus *TRB* é constituído pelos grupos de elementos segmentares *TRBV*, *TRBD*, *TRBJ* e *TRBC*. A formação do gene funcional envolve uma recombinação iniciada sobre as sequências RSS localizadas em 5' de um segmento J e em 3' de um D seguida do rearranjo com um segmento *TRVB* fazendo a junção  $V_B-DJ_B$  que codifica os domínios variáveis da cadeia  $\beta$  do TCR. O gene *TRB* contém dois segmentos constantes C semelhantes constituídos por vários elementos conservados de ancoragem da cadeia e processamento de sinal. No locus *TRA* estão inclusos os elementos do locus *TRD*. As células comprometidas à linhagem T  $\alpha\beta$  fizeram anteriormente uma recombinação VDJ não produtiva dos alelos *TRD*, para a formação do alelo *TRA* fazem uma deleção completa dos genes *TRD* fazendo um rearranjo combinando as sequências  $\delta\text{Rec}-\psi J\alpha$ . O fragmento de DNA excisado forma um círculo que contém sinal de excisão e é denominado de sjTREC. No DNA somático fica o sinal de codificação  $\delta\text{Rec}-\psi J\alpha$  que é excisado para formar o rearranjo  $V_A-J_A$  como um segundo círculo denominado de cjTREC. As sequências resultantes são transcritas e processadas formando um RNAm maduro, que retira sequências intrônicas e coloca na grelha de leitura o segmento constante C, que codifica a região de reconhecimento dos coreceptores CD4 e CD8 e as regiões de ancoragem. L, sequência líder; V, segmentos variáveis; D, segmentos de diversidade; J, segmentos de junção; C, região constante; H, sequência de conexão; Tm, região transmembranar; CT, região transmembranar; sj, sinal de junção; cj, junção codificante; TREC, círculo de excisão do recetor de células T. (Figura adaptada de Kuby, Immunology 5th Edition, 2012, complementada com informação de Van Zelm M. et al, 2011 [176])

O rearranjo combinatório V-J do gene *TRA* resulta na deleção dos genes *TRD* e envolve dois passos. No primeiro passo é realizado o rearranjo das sequências  $\delta\text{Rec}$  e  $\psi J\alpha$  localizadas a montante e jusante do locus *TRD*. O resultado é um círculo de DNA excisado que contém as sequências de sinalização da junção denominado sjTREC (signal joint T cell receptor excision circle) e uma sequência de codificação no

DNA somático  $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha$  (Figura 12). O círculo de DNA formado neste rearranjo é normalmente quantificado nas células circulantes, como um marcador de células  $\text{T}\alpha\beta$  que fizeram a educação tímica [217, 218]. A segunda recombinação faz a junção combinatória  $\text{V}_A\text{-J}_A$  e produz um segundo círculo de DNA, contendo agora, a sequência de codificação  $\delta\text{Rec}\psi\text{J}\alpha$  (cjTREC).

Para a síntese da cadeia  $\beta$  é necessário o rearranjo combinatório VDJ do locus TRB, que é feito em dois passos consecutivos. O primeiro faz a junção de um segmento  $\text{D}_B$  a um  $\text{J}_B$ , o segundo junta um segmento variável  $\text{V}_B$  ao rearranjo parcial  $\text{DJ}_B$ . O gene rearranjado é transcrito com um elemento C localizada a jusante como um pre-RNA mensageiro. Este transcrito primário é processado, de forma a originar um RNAm maduro traduzido como a cadeia polipeptídica  $\beta$  (Figura 12).

A região variável do TCR é constituída pelos domínios CDR1 e CDR2 codificados pelo segmento V que fazem o reconhecimento molecular das moléculas HLA. Um terceiro domínio CDR3 é codificado pelas sequências resultante da junção  $\text{VJ}_A$  e  $\text{VDJ}_B$ , é extremamente variável e faz a interação com o péptido Ag apresentado pela molécula HLA [216]. A análise da diversidade do CDR3 em termos de dimensão é um método de avaliar a diversidade do repertório TCR nas células T circulantes [219].

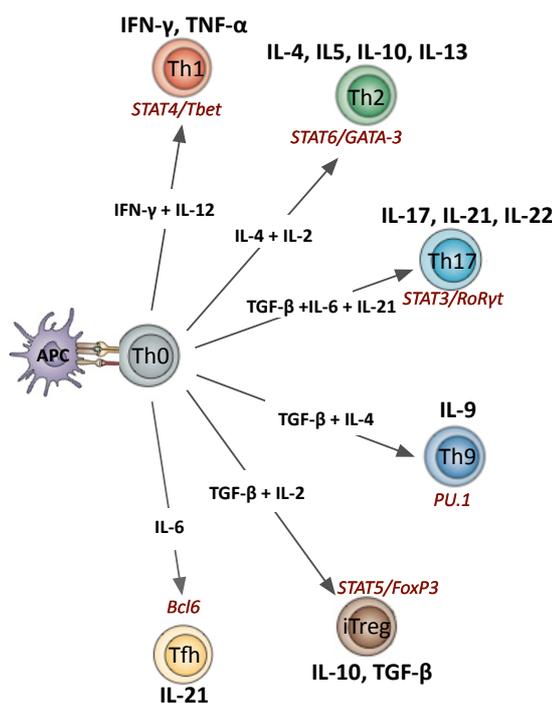
Os locus genéticos que codificam o TCR são sujeitos a exclusão alélica, o que implica que cada célula que fez o desenvolvimento tímico, expressa uma forma única do TCR. Durante o processo de ativação mediado por Ags ou outros é promovida a proliferação celular, o que expande o repertório clonotípico das células T [216].

### 1.3.3.2. A Diversidade Funcional das Células T $\text{CD4}^+$

As células T  $\text{CD4}^+$  atuam como células auxiliaadoras e reguladoras centrais, dos efetores celulares da resposta imunológica adaptativa e também da inata. São responsáveis pelos estímulos auxiliaadores, que polarizam a reação imune, conduzindo a uma resposta mediada por Acs ou por efetores celulares citotóxicos. Outras células T  $\text{CD4}^+$ , como a Tregs, são responsáveis pela manutenção da homeostase imunológica.

A enorme dimensão das funcionalidades das células T  $\text{CD4}^+$  deve-se ao potencial de expressão de um conjunto alargado de genes, que codificam moléculas imunoreguladoras, como citocinas e quimiocinas, que modelam a atividade, diferenciação e proliferação de outras células. Têm vindo a ser identificadas várias subpopulações de células T  $\text{CD4}^+$  efectoras, todas com origem num precursor comum que fez o desenvolvimento no timo. Algumas populações celulares, como a Treg naturais (nTreg) e NKT fazem uma diferenciação com características de linhagem, na

medida em que emergem do timo, já com funcionalidades próprias. No entanto, a maior parte das células T CD4<sup>+</sup> efetoras fazem uma diferenciação a partir das células T CD4<sup>+</sup> naíve, que emergem também do timo. As células T CD4<sup>+</sup> naíves logo após emergirem do timo apresentam o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> [220, 221]. As células naíves circulantes, que apresentam o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, fazem com o TCR o reconhecimento do ligando cognato Ag-HLA classe II, que induz uma cascata de sinais intracelulares mediados por moléculas acessórias do complexo do TCR, e se em simultâneo, for desenvolvido um sinal co-estimulatório pelo eixo recetor-ligando CD28-B7, as células passam a um estado ativado. O estado ativado das células T CD4<sup>+</sup> traduz-se num aumento da produção de IL-2. Esta citocina, induz a entrada das células no ciclo celular e uma sensibilidade aos níveis de citocinas presentes no microambiente. Níveis elevados de determinadas citocinas, induzem nas células a expressão de fatores de transcrição que ligam especificamente elementos regulatórios de genes que codificam citocinas e outros fatores de transcrição.



**Figura 12 – Diferenciação e perfis funcionais das subpopulações de células Th CD4<sup>+</sup> efetoras.**

A ativação das células T CD4<sup>+</sup> naíves dirigida por um Ag cognato, induz a proliferação celular e uma diferenciação dependente do contexto ambiental em que se encontram as células. A ativação das células na presença de moléculas pro-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$  e a IL-12, induz uma diferenciação Th1 caracterizada pela expressão do fator nuclear Tbet indutor da expressão de IFN- $\gamma$  e outras citocinas pro-inflamatórias. Os sinais intracelulares que resultam da presença de IL-4 no ambiente celular, induzem a expressão de GATA3, um fator que ativa a expressão de citocinas como a IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que constituem o perfil Th2 promotor das respostas mediadas por células B. O TGF- $\beta$  inibe a diferenciação Th1 e Th2, mas é um fator transversal à diferenciação de outras subpopulações Th. As células ativadas na presença de TGF- $\beta$ , IL-6 e

IL-21, assumem uma diferenciação em Th17 caracterizada pela síntese específica de IL-17 e das citocinas desta família IL-21 e 22. A expressão destes genes é regulada pelo fator RoR $\gamma$ t. A presença da mesma citocina associada a IL-4 promove a diferenciação numa população Th, reconhecida muito recentemente, que é próxima da Th2, mas distingue-se pela capacidade produtora de IL-9. Esta população é denominada de Th9 e tem a sua atividade regulada pelo fator PU.1. Na presença de TGF- $\beta$  e IL-2 é induzida a diferenciação das células iTreg produtoras de fatores anti-inflamatórios sob regulação do FoxP3. As células T auxiliaadoras da reação imune do centro germinativas, as células T auxiliaadoras foliculares (Tfh), são diferenciadas através de sinais mediados pela IL-6 e apresentam a expressão do fator de transcrição Bcl6. (Figura adaptada de Russ et al. 2013 [222], complementada com informação de Wan et al, 2009 [223])

Desta forma, as células adquirem um perfil efetor, traduzido como uma eficiência elevada na produção de uma ou algumas citocinas específicas [223]. As citocinas produzidas, juntamente com o fator de transcrição regulador, constituem uma 'assinatura' das seis subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> efetoras reconhecidas atualmente: Th1, Th2, Th17, Th9, Treg e Thf (figura 12).

Com a resolução da resposta imunológica, a população de células efetoras que foi diferenciada e expandiu sofre uma contração abrupta [224]. No entanto, a partir da população de células T CD4<sup>+</sup> naíves inicialmente ativada, desenvolve-se uma pequena população de células que apresentam as seguintes características diferenciadoras da memória imunológica [225-227]:

- apresentam um potencial de renovação por proliferação mesmo na ausência de Ag,
- são células circulantes normalmente num estado quiescente, com grande longevidade,
- apresentam uma expressão elevada de recetores de quimiocinas e moléculas de adesão, que lhes permitem responder rapidamente a gradientes quimiotáticos produzidos na inflamação e a residência em locais de vigilância imunológica (mucosas e epitélios tecidulares),
- no encontro com o Ag cognato fazem uma diferenciação e proliferação rápida para células efetoras.

A população de células T de memória funciona como um repositório dinâmico de células T com experiência antigénica, quer CD4<sup>+</sup> quer CD8<sup>+</sup>, que se acumula ao longo da vida. São reconhecidas subpopulações celulares fenotipicamente distintas, com capacidades diferentes de circulação, migração e capacidades efetoras diferenciadas. À semelhança do compartimento de memória B, é estabelecida uma divisão em memória reativa e memória protetora. A primeira é mediada por células T sem capacidade efetora que ao receberem estímulo antigénico por APCs nos tecidos linfoides secundários, fazem uma proliferação intensa com diferenciação para células efetoras. Estes atributos funcionais são específicos das células T de memória central (T<sub>CM</sub>) e de uma população celular descrita muito recentemente como células T de

memória com propriedades estaminais ( $T_{SCM}$ ) [228]. A segunda, a memória protetora, é mediada pelas células T de memória efetoras ( $T_{EM}$ ), que migram para os tecidos periféricos inflamados e estabelecem uma função efetora protetora imediata [229]. As primeiras células a estabelecer características de memória são as células estaminais de memória ( $T_{SCM}$ ) com o fenótipo naíve  $CD4^+CD45RA^+CCR7^+CD27^+CD28^+$  mas que apresentam uma expressão muito elevada dos marcadores de memória  $CD95$  e  $CD122$  [230]. Estas células têm capacidade de autorrenovação e multipotência características das células estaminais. São células Ag experientes e a sua ativação resulta numa diferenciação em células de memória central e de memória efetora [231, 232].

As células  $T_{CM}$  constituem um estadio mais avançado de maturação e apresentam o fenótipo  $CD4^+CD45RA^-CCR7^+CD27^+CD28^+$ . Estas células perdem a expressão  $CD45RA$  (expressam a isoforma curta  $CD45RO$ ) e apresentam uma expressão constitutiva dos recetores  $CCR7$  e  $CD62L$  necessários à extravasão celular através das vênulas endoteliais altas e migração para os tecidos linfoides [233]. São células altamente sensíveis ao estímulo pelo complexo do TCR e menos dependentes do sinal co-estimulatório. Apresentam uma expressão aumentada de  $CD40L$ , o que promove a interação com APCs e células B [229]. Já a população  $T_{EM}$  é constituída por células de memória que perderam a expressão de  $CCR7$  e  $CD27$ , apresentando então o fenótipo  $CD4^+CD45RA^-CCR7^-CD27^-CD28^+$ . Estas células têm uma expressão aumentada de recetores de quimiocinas e moléculas de adesão, que lhes permitem uma migração rápida para os tecidos inflamados onde assumem rapidamente funções efetoras. Com base no perfil de expressão de recetores de quimiocinas destas células, são reconhecidos os potenciais de diferenciação Th1 e Th2 [234].

Uma quarta população de células de memória deverá ser derivada da  $T_{EM}$  e readquire a expressão de  $CD45RA$ . É denominada de células de memória efetoras terminalmente diferenciadas ( $T_{EMRA}$ ) e apresentam normalmente o fenótipo  $CD4^+CD45RA^+CCR7^-CD27^-CD28^+$ . Esta fração de células tem uma frequência baixa na circulação e apresenta marcadores de senescência, como telómeros curtos ou a expressão de  $CD57$  [224]. Desta forma, as células  $T_{EMRA}$  apresentam uma capacidade proliferativa e funcional baixa, para além de uma tendência pro-apoptótica. Tendo em conta estas características, as células  $T_{EMRA}$   $CD4^+$  são consideradas um estadio de diferenciação terminal com baixa capacidade efetora.

### 1.3.3.3. A Diversidade do Compartimento Celular T CD8<sup>+</sup>

A defesa antitumoral, e em particular, a imunidade a agentes patogênicos intracelulares, é mediada pelas células T CD8<sup>+</sup> com capacidades efetoras citotóxicas, as CTLs. As células T CD8<sup>+</sup> naíves em resposta a um Ag sofrem um processo de ativação iniciado pela sinalização via TCR conjuntamente com sinais de co-estimulação celular pelas APCs e sinais induzidos por mediadores solúveis inflamatórios que resulta na diferenciação em CTLs.

De forma homóloga à resposta T CD4<sup>+</sup>, também a resposta primária mediada por células T CD8<sup>+</sup> apresenta três fases características: primeiro, uma fase de diferenciação e expansão; seguida de uma fase de contração da população das CTLs formadas por morte celular e finalmente, o estabelecimento e manutenção da memória imunológica mediada por estas células [235-237].

Desta forma, com a ativação, as células fazem uma proliferação clonal massiva e uma diferenciação, de que resulta uma população heterogênea de células em relação à especialização efetora, à capacidade proliferativa, à longevidade e mesmo à localização anatômica [237]. As CTLs terminalmente diferenciadas são reconhecidas com base na expressão dos receptores CD8 e CCR5, na capacidade de produção de IFN- $\gamma$  e de produzir e armazenar, em grânulos intracelulares, as proteínas citotóxicas perforina e as granzimas A/B (com atividade citolítica e pro-apoptótica respectivamente) [235]. A contração da população de CTLs é presumivelmente um mecanismo que mantém a flexibilidade de responder a novas infecções ao criar espaço para outras expansões celulares, e simultaneamente, minimizar o risco de imunopatologia, presente devido ao número elevado de CTLs citotóxicas em circulação ou nos tecidos [238]. A pequena fração celular restante, faz uma diferenciação progressiva para células de memória.

Estão propostos vários modelos para o processo de diferenciação terminal das células T CD8<sup>+</sup> [237, 239, 240]. No modelo que reúne mais consensos, é aceite que da proliferação clonal surgem dois tipos de células [241]. As primeiras, são células efetoras de vida curta (SLECs, short-lived effector cells). Estas SLECs constituem a maioria do *pool* celular diferenciado, possuem uma elevada capacidade migratória para virtualmente todos os tecidos, onde atuam principalmente como CTLs no controle da infecção [237]. Na fase de contração, estas são as células eliminadas. As segundas células diferenciadas, são os precursores das células de memória (MPECs, memory precursor effector cells). As MPECs têm um fenótipo menos diferenciado, são multipotentes na medida em que podem evoluir para células de memória ou CTLs efetoras, têm um elevado potencial de sobrevivência e mesmo capacidade de

autorrenovação [241]. Estas células fazem uma evolução progressiva para células de memória. Com a diferenciação final como células de memória, adquirem as propriedades únicas de proliferar em resposta a citocinas como a IL-15 e responder de forma rápida e robusta a infecções secundárias, adquirindo funcionalidades CTL [235]. Os estádios de diferenciação SLEC e MPEC, resultam muito provavelmente, da intensidade da totalidade do sinal estimulatório ambiental recebido, que inclui a avides da interação TCR-Ag/HLA classe I, a co-estimulação e os sinais inflamatórios. Um sinal elevado induz uma expansão clonal grande e uma diferenciação terminal (as células SLEC), um sinal fraco permite a adoção de um programa genético que induz uma diferenciação progressiva das células, mantendo capacidades proliferativas e de autorrenovação (as células MPEC) [239].

A estimulação ambiental dita variações na expressão intracelular e atividade de vários fatores de transcrição, que determinam a regulação intrínseca da diferenciação terminal T CD8<sup>+</sup>. Estes fatores, estabelecem um controlo do transcriptoma celular, por indução ou repressão direta da expressão genética, ou através da modificação do estado epigenético dos genes [242, 243]. A regulação epigenética é estabelecida a dois níveis: com modificações nas histonas e mudanças estruturais na cromatina nos loci dos genes efetores das CTLs e das células de memória tornando-os acessíveis ou não para transcrição; ou promovendo a metilação ou demetilação de regiões CpG reguladoras de genes efetores tornando-os ativos ou não [222].

**Tabela 2 – Fenótipos funcionais associados à diferenciação efetora das células T CD8<sup>+</sup>.**

	Naíves	Educação Ag				
		CTL <sub>E</sub>	T <sub>SCM</sub>	T <sub>EM</sub>	T <sub>CM</sub>	T <sub>EMRA</sub>
<b>Migração/Proliferação</b>						
CCR7	+++	-	+	-	+++	-
CD62L	+++	-	+	-	+++	+
CD122	-		+	+	+	+
CD127	++	+/-		+	+++	-
<b>Co-estimulação/Sobrevivência</b>						
CD45RA	+++	-	+	-	-	+
CD45RO	+	+++	+	+++	+	-
CD27	++	-	+	-	+	-
CD28	++	-	+	-	++	-
<b>Citolíticas</b>						
CD95	-	+++	++	++	+/-	+
Grz	-	+++		+/-	-	+++
Perf	-	+++		+/-	-	+/-

CTL<sub>E</sub>, linfócito T CD8<sup>+</sup> citotóxico; T<sub>SCM</sub>, célula T estaminal de memória T<sub>EM</sub>, célula T de memória efetora; T<sub>CM</sub>, célula T de memória central; T<sub>EMRA</sub>, célula T de memória efetora terminalmente diferenciada.

A combinação +/- indica o nível de expressão por citometria de fluxo (percentagem ou intensidade de fluorescência).

(Adaptado de Broere, F. et al. 2011 [244]; complementado com informação de Mahnke, Y et al, 2013 [224] e Flynn, J et al 2014 [230]).

As populações celulares T CD8<sup>+</sup> são caracterizadas de forma homóloga às populações celulares de memória T CD4<sup>+</sup> com base no seu fenótipo funcional, na distribuição tecidual e capacidades migratórias. Desta forma, são convencionalmente definidas para as T CD8<sup>+</sup>, as mesmas subpopulações celulares naíves, efetoras, estaminais de memória, de memória efetoras, de memória central e de memória terminalmente diferenciadas (tabela 2).com as propriedades funcionais e localizações semelhantes às discutidas na secção anterior.

## 1.4. O Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas

A transplantação de células estaminais hematopoiéticas (TCE), também denominada de forma generalista como transplantação de medula óssea, foi conceptualmente desenvolvida há mais de 50 anos, como um tratamento para a recuperação de doentes sujeitos acidentalmente a dose letais de radiação nuclear [245].

A transplantação de células progenitoras hematopoiéticas é hoje uma terapêutica com aplicações bem definidas em doenças congénitas hematológicas ou imunodeficiências, e ainda em patologias hemato-oncológicas [246]. Para isso contribuíram diferentes fatores de ordem científica e técnica, mas também organizacionais, e entre os mais importantes constam:

- a descoberta e caracterização do sistema de antígenos de histocompatibilidade humano (HLA)
- o desenvolvimento farmacológico de medicamentos cito-estáticos e imunomoduladores importantes no controlo terapêutico da doença neoplásica e no condicionamento pré-transplante,
- o desenvolvimento de agentes terapêuticos imunossupressores que permitem transpor as barreiras da aloreatividade,
- o aumento do conhecimento da biologia das CEHs,
- e considerando a diversidade do sistema HLA, a organização de uma rede de registos mundial de dadores voluntários de células que permitiu aumentar a probabilidade de encontrar dadores com identidades HLA aceitáveis para a transplantação alogénica com riscos aceitáveis de complicações derivadas da aloreatividade.

No entanto, é uma terapêutica especializada e onerosa que é condicionada a centros especializados, uma vez que envolve a criação de infraestruturas com especificações próprias, assim como a preparação de profissionais de saúde especializados em cada uma das fases do processo de transplante. Por outro lado, o TCE tem associados riscos significativos de morbilidade e mortalidade, quer por recidiva da doença primária, quer secundárias à imunossupressão iatrogénica, ou ainda secundárias à aloreatividade do enxerto [246].

### 1.4.1. Fontes de Células Estaminais Hematopoiéticas para Transplante

As CEHs podem ser obtidas a partir de colheitas de medula óssea (MO) por punção óssea geralmente na crista ilíaca, por mobilização com fatores de crescimento e

colheita a partir do sangue periférico (PBSC, peripheral blood stem cell) e ainda de células de sangue de cordão umbilical (UCB, umbilical cord blood) [247-249].

As células obtidas por cada uma destas técnicas têm algumas características diferentes, procurando-se que tenham boa capacidade funcional e potencial de enxerto, de forma a reconstituir de forma rápida a hematopoiese [250].

As UCBs têm limitações próprias da sua fonte de obtenção, pelo que a sua utilização depende do número de células e das características do doente. Geralmente os bancos de células do cordão disponibilizam unidades que tenham mais de  $1 \times 10^9$  células. Estas células apresentam um maior potencial de enxerto e uma maior imaturidade o que aumenta a tolerância devido a uma menor aloreatividade [248, 251].

As células obtidas pelos diferentes métodos apresentam diferenças substanciais em relação às frequências de subpopulações celulares de CEHs, células progenitoras e linfócitos [248, 252-254]. As UCBs apresentam características mais embrionárias, mostraram ter a maior capacidade LTC-IC [32] apresentando-se a população  $CD34^+$  com uma maior frequência relativa de células primitivas  $CD34^+CD38^-$  e uma menor frequência de progenitores comprometidos [255, 256]. Os linfócitos são maioritariamente células imaturas  $CD45RA^+$  com uma capacidade citotóxica limitada após ativação o que contribui para uma menor aloreatividade das células do sangue do cordão umbilical com uma menor incidência de doença contra hospedeiro (GVHD, graft versus host disease), e por isso maior permissividade na necessidade de compatibilidades HLA [252, 257].

Quanto à MO, este produto é colhido, normalmente em doadores adultos, através de múltiplas punções/aspirações ósseas nas cristas ilíacas. A rutura dos sinusoides da MO possibilita a colheita de sangue venoso enriquecido em CEHs [251]. O compartimento  $CD34^+$  deste produto contém comparativamente aos outros, uma menor frequência de CEHs primitivas [255] e uma frequência significativamente maior de células progenitoras [248, 256].

A utilização de PBSCs implica a mobilização periférica de CEHs o que se consegue mediante a administração de G-CSF e a colheita ulterior destas células por citaferese. A segurança da utilização deste produto para transplante foi demonstrada em três trabalhos fundamentais onde foi demonstrada uma rápida recuperação hematológica nos doentes transplantados com PBSCs e as incidências de complicações não foram significativamente diferentes das associadas ao transplante com MO [258-260]. Em relação aos doadores, não foram referidas complicações significativas após a administração do fator de crescimento. Quanto ao conteúdo celular, há vantagens na utilização de PBSCs, dado ser possível a colheita de elevados números de células  $CD34^+$  para infusão, o que está correlacionado não só com um menor tempo de

recuperação hematológica, mas também com a diminuição das recidivas da doença primária [247]. Qualitativamente, o enxerto de PBSCs, apresenta frequências fenotípicas de células primitivas ( $CD34^+CD38^+$ ) semelhantes ao UCB [256, 261] e também uma proporção elevada de progenitores mieloides. Apresenta, no entanto, uma frequência muito mais elevada de linfócitos maduros comparativamente à MO, facto que pode condicionar a evolução do transplante em termos de complicações derivadas da resposta alogénica. No entanto, uma vez que o G-CSF induz uma polarização das células T para fenótipo Th2 anti-inflamatório, a incidência de complicações imunológicas não difere muito quando são comparados os transplantes de PBSCs e de MO, exceto no que diz respeito à incidência de doença de GVHD crónica [248, 262].

#### **1.4.2. A Preparação do Doente para o Transplante**

Os protocolos de condicionamento pré-transplantação são um passo comum cujos objetivos principais são [262, 263]:

- (a) fazer uma cito-redução,
- (b) a erradicação ou controlo de longo-termo da doença,
- (c) a imunossupressão do recetor de forma a evitar a rejeição do enxerto,
- (d) minimizar a doença de enxerto contra hospedeiro deixando no entanto lugar ao efeito enxerto contra leucemia, nos casos em que é esse o objetivo terapêutico
- (e) e idealmente ter o mínimo de toxicidade para outros órgãos e tecidos

Os protocolos de condicionamento clássicos são mieloablativos, baseados em associações de quimioterapia, com ou sem irradiação corporal total (TBI, Total Body Irradiation). Podem ainda ser utilizados outros regimes mieloablativos, baseados em altas doses de quimioterapia sem TBI [264].

Nos doentes submetidos a aloTCE que desenvolvem doença do enxerto contra o hospedeiro a incidência de recaídas é menor, admitindo-se que as células alogénicas transplantadas para além de fazerem a recuperação hematológica desempenham uma ação imunológica antitumoral que se traduz no efeito enxerto contra tumor (GvT, Graft *versus* Tumour) [265, 266]. Este conceito levou ao desenvolvimento de regimes de condicionamento de intensidade reduzida ou sub-mieloablativos [264].

#### **1.4.3. O Enxerto**

O sucesso do TCE depende da capacidade de as CEHs infundidas, migrarem para o microambiente da MO e atingirem aos nichos estaminais, e aí iniciarem os processos de autorrenovação e a repopulação das várias linhagens hematopoiéticas no doente

[267]. Após a infusão intravenosa, as CEHs recirculam acumulando-se inicialmente nos pulmões [268]. Nas 24 a 48 horas após o transplante, migram para a MO e por um processo de rolamento pelo endotélio vascular e extravasão atingem a matriz da MO. Este processo é modelado por várias interações moleculares, sendo as mais relevantes as estabelecidas moléculas adesão e gradientes quimiotáticos [269, 270]. O primeiro passo, o rolamento e imobilização das CEHs no endotélio, é estabelecido entre selectinas como a VCAM-1 do endotélio e as integrinas sialomucinas e o CD44 expressas pelas CEHs [251]. De seguida, ganha importância o eixo CXCL12/CCR4, que intensifica a adesão celular e modula a adesão e equilíbrio das CEHs nos NEH do endóstio.

O primeiro indicador clínico de um enxerto funcional, é a recuperação do número de neutrófilos, com uma contagem sustentada de neutrófilos superior a 500 células/ $\mu$ l no sangue periférico (ANC500), seguida de uma recuperação, também sustentada, do número de plaquetas para uma contagem superior a 20 000 células/ $\mu$ l no sangue periférico [251].

A recuperação hematológica está associada a algumas manifestações clínicas de natureza imunológica, denominadas de síndrome de enxerto [271, 272] que surge, no contexto do transplante autólogo e alogénico, devido ao aumento súbito dos níveis de citocinas pro-inflamatórias associado ao aumento dos neutrófilos [273].

#### **1.4.4. O Transplante Autólogo**

O transplante autólogo de CEHs (autoTCE) constitui uma terapia de suporte hematopoiético após a administração de altas doses de quimioterapia mieloablativa [250]. Estes transplantes são feitos com PBSCs, o que implica uma mobilização prévia de CEHs no doente, a concentração por citafereze e a criopreservação até à infusão [274].

#### **1.4.5. O Transplante Alogénico**

O transplante alogénico de CEHs (aloTCE), é atualmente visto como uma imunoterapia celular com uma ampla utilização terapêutica na doença neoplásica, principalmente hematológica. No entanto, é também a solução clínica para o tratamento de imunodeficiências primárias e doenças metabólicas e hematopoiéticas congénitas [275].

De forma a minimizar as complicações clínicas da aloreatividade, o enxerto é obtido de um dador previamente selecionado de um painel familiar ou então não-relacionado, com base nas identidades do HLA da classe I e II [276].

#### 1.4.5.1. As Bases Imunológicas da Aloreatividade

A rejeição de tecidos entre indivíduos da mesma espécie é um fenómeno conhecido desde há muito tempo. Na primeira metade do século XX, os trabalhos de P. Medawar e G. Snell estabeleceram, primeiro, a natureza imunológica e celular da reacção de rejeição através de ensaios com enxertos de pele, e segundo, os fatores genéticos de controlo através de estudos de tumorigénese cruzando diferentes linhagens isogénicas de ratinhos. Desta forma, foram identificados os principais loci genéticos envolvidos a que se deu o nome de complexo histocompatibilidade na medida em que condicionavam a compatibilidade entre tecidos [277]. No homem estes genes formam um *cluster* genético denominado de complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC, Major Histocompatibility Complex), localizado no braço curto do cromossoma 6 (6p22.1 a 6p22.3) e que contém cerca de 240 genes, dos quais, cerca de metade têm funções imunológicas. A caracterização dos genes humanos responsáveis pela rejeição de tecidos foi feita inicialmente serologicamente, como antigénios leucocitários e por isso denominados genericamente de HLA (HLA, Human Leucocyte Antigens). Foram reconhecidas duas classes de moléculas, as primeiras expressas por virtualmente todas as células nucleadas e plaquetas sendo codificadas pelos genes do HLA classe I, as segundas de expressão constitutiva restrita a células B e APCs são codificadas pelos genes HLA da classe II.

Os genes do HLA da classe I (*HLA-A, B e C*) e da classe II (*HLA-DR, DQ e DP*) têm uma expressão codominante e constituem o sistema genético mais polimórfico do genoma humano. Ao nível populacional, são conhecidas milhares de variantes alélicas destes genes [277]. Ao nível individual a diversidade é também multigénica, sendo expressos um máximo seis alelos HLA classe I e até oito do HLA classe II (se forem consideradas as duplicações do gene *DRB*) [276].

As moléculas HLA são responsáveis pela apresentação de Ags às células T através do complexo HLA(próprio)-Ag-TCR. O processo de aloreconhecimento envolve uma ativação das células T CD4+ e CD8+ através dos complexos HLA(alogénico)-Ag-TCR (reconhecimento direto) ou das células T CD4+ pelos complexos HLA(próprio)-Ag(alogénico)-TCR (reconhecimento indireto). Mais recentemente, foi proposta uma terceira via de aloreconhecimento semidirecta, que inclui a transferência de moléculas HLA próprias e alogénicas entre APCs, em particular por DCs imaturas [278], o que levaria à ativação de células T que reconhecessem as moléculas HLA alogénicas.

Uma segunda classe de aloantigénios, são os Ags minor de histocompatibilidade (mHA). Os mHA são péptidos derivados de proteínas cujos genes apresentam algum grau de polimorfismo na população ou estão no cromossoma Y. Um facto importante é

a apresentação destes Ags ser HLA restrita, pelo que só existe risco de aloreatividade, quando no par dador-recetor está presente a disparidade no Ag e o alelo HLA com afinidade pelo Ag [279].

Importa referir ainda a aloreatividade mediada por células NK, assenta nas disparidades entre os recetores KIR e respetivos ligandos HLA do par dador-recetor. Já foi referenciado que as interações KIR-HLA regulam a atividade citotóxica das células NK e são a base da tolerância destas células ao próprio. Num contexto autólogo, a transformação celular com alterações ou ausência de expressão dos ligandos HLA, leva à ativação das funções citolíticas das células NK, devido à ausência de um sinal inibitório induzido pelo complexo KIR-ligando HLA (modelo do 'missing-self'). Num contexto alogénico com disparidades HLA (p. ex., aloTCEs haploidênticos), pelo mesmo princípio, a ausência de ligandos KIR irá promover a ativação das células NK, que apresentem os recetores inibitórios KIR específicos dessas células [280]. Desta forma, é induzida a aloreatividade NK, que no sentido dador-versus-recetor tem um papel fundamental no controlo da recidiva da doença tumoral, potenciando o efeito terapêutico GvT do transplante [145, 281, 282].

#### **1.4.5.2. Complicações Imunológicas: a Rejeição de Enxerto e a Doença de Enxerto contra Hospedeiro**

A incapacidade de o doente recuperar a função hematopoiética após o transplante, ou a perda desta função após uma recuperação inicial, constitui a falência de enxerto. Entre os fatores que podem contribuir para a falência do enxerto, está o doseamento inadequado de CEHs, o condicionamento preparativo utilizado, a depleção de células T no enxerto, as infeções e as incompatibilidades HLA [283]. O ultimo fator está relacionado com a rejeição imunológica das células do enxerto por células imunocompetentes aloreativas do recetor. Estas reações são mediadas principalmente por células T ativadas por aloantígenos HLA ou mHA. Há no entanto, fortes indícios de que em determinados contextos pode haver um envolvimento do braço humoral B no processo de rejeição do enxerto [284].

Uma das principais dificuldades para a indicação e sucesso clínico do aloTCE, é a incidência elevada no pós-transplante de doença de enxerto contra hospedeiro (GvHD, *Graft versus Host Disease*). O desenvolvimento de GvHD depende de fatores como a idade do recetor e do dador, a toxicidade do regime de condicionamento e o tipo de enxerto. Já a extensão e severidade da GvHD está fortemente correlacionada com o grau de disparidades HLA no par dador/recetor [283]. Com a exceção dos transplantes entre gémeos idênticos (aloTCE singénico) e dos dadores relacionados

para crianças com imunodeficiências primárias combinadas graves, todos os outros aloTCEs exigem profilaxia preventiva da GvHD [285]. A profilaxia e as estratégias terapêuticas para controle da GVHD incluem uma seleção criteriosa do dador com base nas compatibilidades alélicas dos loci HLA classe I e II clássicos com o receptor, o uso de agentes anti-inflamatórios e imunossuppressores como corticosteroides, metotrexato, ciclosporina, mofetil micofenolato, sirolimus e mais recentemente agentes monoclonais inibidores do TNF e anti-timócito [286-288]. Algumas terapias celulares imunossuppressoras envolvendo as células Treg e células estaminais mesenquimatosas estão atualmente em investigação, como forma de promover a tolerância imunológica [289-291].

A GvHD apresenta uma forma aguda (aGvHD), com um desenvolvimento normalmente nos primeiros 100 dias pós-transplante. A aGvHD resulta da resposta de células T aloreativas do dador tendo como alvo tecidos e órgãos do receptor (principalmente pele, fígado, intestino e tecidos linfoides) [292]. Uma outra forma da doença, com características crônicas (cGvHD) surge mais tardiamente (entre os 100 dias e os 24 meses) e pode ter outros mecanismos fisiopatológicos. A cGvHD apresenta manifestações clínicas variáveis, mas mais próximas a condições autoimunes vasculares e imunodeficiências, com fibrose e esclerose a afetar vários tecidos e órgãos (pele, fígado, olhos e várias mucosas) e uma reconstituição imunológica muito deficitária [292, 293].

#### **1.4.5.3. O Transplante Alogénico como Imunoterapia: o Efeito Enxerto versus Tumor**

O efeito GvT refere-se à capacidade que os linfócitos alogénicos, presentes no enxerto, ou derivados do enxerto ou infundidos após o transplante, têm em destruir as células tumorais presentes no receptor. A gestão do pós-transplante inclui um balanço desta aloreatividade terapêutica com a aloreatividade nociva da GvHD [294].

A capacidade GvT é largamente dependente da imunidade mediada por células T, pelo que a depleção de células T no enxerto condiciona a menor eficácia da resposta do enxerto contra a neoplasia. A menor expressão de moléculas do MHC nas células tumorais condiciona também este efeito [295, 296]. Mais, está firmemente estabelecido que este efeito depende em larga medida do reconhecimento aloreativo de mHA nas células leucémicas do receptor e também, em caso de disparidade, de aloantígenos HLA.

São conhecidos vários Ags tumorais imunogénicos associados à leucemia (p. ex., o BCR-ABL, o TEL-AML1 ou o PML-RAR $\alpha$ ) [297], no entanto, o efeito GvT direto contra

estes Ags parece ser pouco efetivo. Uma explicação possível para a vantagem dos aloantígenos na indução da resposta GvT, poderá ser o facto, de haver uma seleção negativa de células leucémicas com expressão elevada de Ags tumorais imunogénicos. Desta forma, as células leucémicas da recidiva deverão apresentar uma frequência baixa de Ags tumorais enquanto apresentam uma expressão normal de aloantígenos, o que favorece a resposta por células T aloreativas [294].

As células NK são a primeira população linfocitária a reconstituir após o TCE e tem vindo a ser avaliado o seu potencial GvT, que parece ser predominantemente dirigido contra células leucémicas da linhagem mieloide. Os doentes com leucemias mieloides, submetidos a aloTCE haploidêntico com enxerto depletado de células T, com disparidades KIR-Ligando HLA, mostraram uma capacidade significativa de controlo da doença; devido a atividade antitumoral das células NK, derivadas do enxerto, contra as células leucémicas que não expressavam o ligando HLA dos recetores KIR do dador [298, 299].

No transplante com compatibilidade HLA, onde a aloreatividade NK mediada pelos recetores KIR é irrelevante, outros estudos exploraram a imunogenética dos recetores KIR no dador e recetor e indicaram que o conteúdo de genes de recetores de ativação e/ou a expressão de determinados recetores KIR está associado a um menor risco de recidiva de leucemias mieloides [300-302].

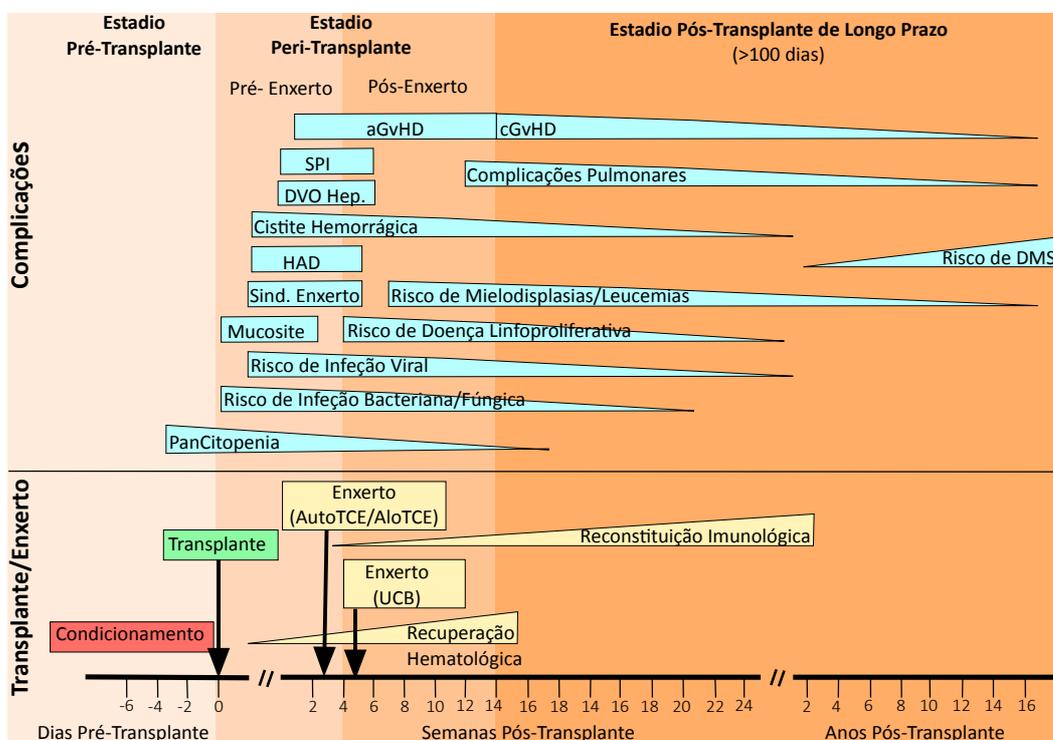
#### **1.4.6. A Evolução e Outras Complicações do Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas**

As elevadas doses de radiação e quimioterapia administradas no condicionamento cito-redutor, na preparação para o transplante, afeta todos os órgãos e tecidos do doente, debilitando-o e produzindo sintomatologia que exige suporte clínico. Durante o período peri-transplante e devido à aplasia medular e degradação da mucosa oral, os doentes transplantados são normalmente dependentes de uma combinação de cuidados hospitalares incluindo o suporte transfusional de produtos sanguíneos e nutrição parentérica. Devido ao estado severamente imunocomprometido, o risco de infeção é muito elevado pelo que os doentes estão normalmente em condições de isolamento e sob antibioterapia.

Com a tomada e acomodação do enxerto inicia-se a regeneração hematopoiética em que os doentes fazem a recuperação mieloide e saem da neutropenia e da trombocitopenia. Surgem, no entanto, nesta altura, os maiores riscos de complicações imunológicas graves aloreativas e inflamatórias como a rejeição de enxerto, aGvHD, complicações pulmonares devido a agressão inflamatória e infecciosa (Figura 13).

Permanecem elevados os riscos de infeção por reativação de vírus da família Herpes (CMV, HHV-6, BKV e outros). No final deste período, sobem os riscos de recidiva da doença maligna primária incluindo as doenças linfo-proliferativas, mielodisplasias e leucemias [303].

Com a evolução para o período pós-transplante longo termo, surgem no contexto alogénico, os riscos de cGvHD e em ambos os contextos alogénicos e autólogo um aumento significativo dos riscos de desenvolvimento de doença maligna secundária. Neste período, os doentes fazem uma progressão lenta para reconstituição da diversidade clonotípica dos repertórios imunológicos naives e dos repertórios de células Ag educadas. Esta reconstituição será o objeto da análise e caracterização desenvolvida neste estudo, que será detalhado e discutido nas secções seguintes deste trabalho.



**Figura 13 – Evolução temporal do transplante de células estaminais hematopoéticas e as principais complicações clínicas associadas no pós-transplante.**

As complicações clínicas que surgem no período imediatamente a seguir ao transplante (peri-transplante) estão associadas à agressão celular induzida pelo regime de condicionamento, principalmente sobre as mucosas e endotélios de vários tecidos e órgãos e também devido a alterações hepáticas. Neste período pré-enxerto, a aplasia medular profunda torna os doentes pancitopénicos e severamente imunocomprometidos. Com a tomada do enxerto (primeiro os enxertos de células estaminais periféricas mobilizadas e de medula óssea, mais tardiamente os enxertos de cordão umbilical), os doentes iniciam a recuperação hematológica, manifestando-se várias complicações pós-enxerto de natureza imunológica e infecciosa. Surgem os sintomas do síndrome de enxerto e de pneumonia idiopática, diminui o risco de infeção bacteriana e fúngica, mas aumenta significativamente o risco de infeção viral por agentes da família dos herpes vírus. No contexto alogénico, é neste período que surge a agressão imunológica pela

aGvHD. Com a evolução para o período pós-transplante de longo termo, os doentes iniciam um longo processo de reconstituição imunológica da diversidade dos repertórios linfocitários T e das células B com educação antigénica. Aumenta o risco de cGvHD, complicações pulmonares tardias e recidiva da doença maligna. Com a evolução de anos aumenta significativamente o risco de doença maligna secundária. DVO Hep., doença veno-oclusiva hepática; HAD, hemorragia difusa alveolar; SPI, síndrome de pneumonia idiopática; DMS, doença maligna secundária. (Adaptado de Hollingsworth C. et al, 2008 [303]).

## 2. Objetivos e Hipóteses de Trabalho

Este trabalho faz uma análise integrada da reconstituição imunológica após o transplante de células estaminais hematopoiéticas, a partir do estudo duas séries de doentes, uma submetida a transplante com enxerto autólogo e outra com enxerto alogénico.

A análise foi estabelecida com o objetivo geral de investigar e caracterizar a recuperação da diversidade estrutural e funcional dos compartimentos celulares derivados da hematopoiese, com competência imunológica, após o transplante. A planificação do trabalho foi estabelecida de forma a contribuir para a resposta às questões que surgiram nos seguintes contextos:

**1º-** A recuperação da hematopoiese mieloide está bem caracterizada em relação à cinética e apresenta como principal fator condicionante a dosagem de células CD34+ do enxerto. Já a consolidação da recuperação mieloide após o arranque hematológico está menos caracterizada. Assim, de forma a contribuir para este esclarecimento, neste trabalho foram caracterizadas as evoluções dinâmicas das duas principais populações celulares mieloides circulantes imunocompetentes, os neutrófilos e monócitos. Esta caracterização foi realizada desde o início do período pós-transplante de longo termo (3 meses após transplante) até a um ano de evolução. Desta forma, fez-se a avaliação se os fatores determinantes da cinética do arranque hematológico ou se outros são condicionantes da consolidação da função do enxerto.

**2º-** O potencial antitumoral inato das células NK tem vindo a ser explorado no pós-transplante alogénico para um controlo da doença neoplásica residual mínima. No entanto, mesmo com a alocação de um reportório de genes KIR e ligandos HLA favorável, tem-se revelado difícil antecipar um efeito aloreativo GvT. Provavelmente, será devido a diferenças na reconstituição do compartimento de células NK no pós-transplante.

No transplante alogénico e ao contrário do transplante autólogo, a recuperação e desenvolvimento das células NK está bem caracterizada. Com o início da função do aloenxerto, há uma expansão de células imaturas CD56<sup>++</sup> enquanto a células maduras apresentam uma recuperação retardada e lenta. Por outro lado, tem sido observado que os transplantes com um enxerto sujeito a uma depleção extensa de células T

apresentam uma reconstituição deficiente do compartimento das células NK. Desta forma, tem sido sugerida uma influência das células T no desenvolvimento das células NK.

Assim por forma a contribuir para a elucidação destes eventos foi feita uma avaliação da heterogeneidade da reconstituição das células NK e estabeleceu-se a sua relação com os níveis de células T. Foi caracterizada a dinâmica da recuperação das subpopulações de células NK nos dois modelos de transplantação autóloga e alogénica; o primeiro não sujeito a imunomodulação e o segundo suportado por terapia imunossupressora, moduladora essencialmente, das respostas imunológicas derivadas das células T. Foi ainda avaliada, nos dois tipos de transplantação, a relação entre a composição do compartimento periférico de células NK e os níveis de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes.

**3º-** No contexto do transplante alogénico tem sido proposto que uma atividade aloreativa das células NK do enxerto dirigida contra o recetor é importante para o controlo da doença residual mínima mieloide. Este efeito, poderá, em principio ser promovido pela seleção de um enxerto com um repertório de genes KIR orientado para uma interação com repertório de ligandos do recetor modeladora da educação e da ativação das células NK.

Tendo em consideração que a diversidade germinal do cluster de genes KIR tem uma componente antropológica, várias populações mundiais estão caracterizadas em termos de frequências genótípicas dos genes KIR e também da sua organização haplotípica. Neste estudo, foi caracterizada a diversidade deste cluster imunogenético na população portuguesa e comparada com outras populações geograficamente próximas assim como com a população caucasiana da Europa.

A distribuição destes perfis genóticos na população deverá determinar o repertório de genes KIR alocado no processo de transplantação alogénica. No entanto, não está determinado exatamente em que medida a alocação destes é condicionada pela proximidade genética do par dador-recetor.

Nesta parte do trabalho, é estabelecida a distribuição de genes KIR e de interações com os ligandos presentes nos recetores que teoricamente fazem a captura um potencial aloreativo mediado pelas célula NK em transplantes com diversos tipos de pares dador-recetor. Este estudo poderá ser usado como referência para a avaliação de estratégias de seleção de pares dador/recetor com base na imunogenética dos recetores KIR das células NK.

Foi finalmente avaliado o padrão de reconstituição da expressão genética do

repertório KIR no pós-transplante.

**4º-** A reconstituição do compartimento das células B, após o transplante, é caracterizada por uma expansão muito marcada das células B transitórias, e uma recuperação lenta das populações de células B naíves maduras e de memória. Permanece em discussão se o processo é condicionado por mecanismos de proliferação celular antígeno-independentes com repercussão sobre a diversidade estrutural do compartimento.

Esta questão é abordada neste trabalho, sendo realizada uma análise da cinética da linfopoiese B, da estimativa do número de divisões celulares e da diversidade do repertório IGH, de forma a estabelecer algumas conclusões sobre os principais mecanismos de regeneração do compartimento de células B no pós-transplante. São também avaliados os fatores que condicionam ou indicam a capacidade de recuperação das populações de células B maduras e de memória.

**5º-** A recuperação da linfopenia peri-transplante dos compartimentos celulares T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> segue cinéticas muito diferentes. A reconstituição das células T CD4<sup>+</sup> é lenta e essencialmente dependente da capacidade de regeneração tímica. Já a recuperação quantitativa do compartimento periférico T CD8<sup>+</sup> é estabelecida por uma expansão periférica espontânea, dirigida principalmente por citocinas que induzem a proliferação antígeno-independente de células naíves e de memória. Durante este processo, os doentes apresentam uma capacidade imunológica comprometida. Desta forma, há um interesse considerável numa caracterização abrangente das células T que surgem durante a reconstituição, detalhando a distribuição celular pelas diferentes subpopulações naíves e de memória assim como da definição das capacidades reativas destas células. Nesta parte do trabalho foi avaliado o recobro da atividade tímica e relacionado com a recuperação das diferentes subpopulações de células T periféricas, a evolução da diversidade estrutural e a expressão de marcadores de ativação e competência celular em ambos os compartimentos de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. São ainda avaliados o impacto dos vários fatores clínicos e demográficos na reconstituição das várias populações maduras de células T.



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Características dos Doentes Transplantados e da População Controlo

##### 3.1.1. Transplantes Autólogos

Durante o período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012, foram referenciados para este estudo, 87 doentes submetidos a transplante autólogo de CEHs na Unidade de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil (IPOLFG). O estudo teve autorização do Gabinete de Investigação Clínica e da Comissão de Ética do IPOLFG. Foi obtido consentimento informado de todos os doentes participantes no estudo ou dos seus responsáveis legais.

As características demográficas da população de doentes e outros detalhes clínicos como as doenças primárias e os seus estadios, os regimes de condicionamento do transplante e as características dos enxertos estão sumarizados na tabela 3.

Foi colhido sangue periférico pré transplante dos doentes e dadores e dos doentes aos 3, 6 e 12 meses após o transplante para avaliação da recuperação hematoimunológica. A avaliação aos 12 meses constitui o último ponto de análise do estudo. Neste tempo da evolução pós-transplante, foram avaliadas as correlações dos diferentes fatores clínicos com a extensão da reconstituição imunológica atingida pelos doentes expressa como a recuperação de populações de células naíves, maduras e terminalmente diferenciadas e da diversidade policlonal dos repertórios celulares.

**Tabela 3 – Características clínicas e evolução da população de doentes submetidos a transplante autólogo de células estaminais hematopoiéticas**

	n	%
<b>Doentes</b>	87	
<b>Idade, anos (Média, Intervalo)</b>	50 (2-68)	
<b>Sexo: Masc./Femin.</b>	44/43	50.6 / 49.4
<b>Doença Primária Maligna</b>	87	100
<b>Linfoma Hodgkin</b>	19	21.8
<b>Linfoma Não-Hodgkin</b>	16	18.3
Linf. B Difuso de Células Grandes	4	4.6
Linf. B da Zona Marginal Esplénica	1	1.1
Linf. de Células do Manto	4	4.6
Linf. de Células T	7	8.0
<b>Mieloma Múltiplo</b>	39	44.8
IgA	15	17.2

IgG	16	18.4
Outros	9	9.2
<b>Outros Diagnósticos</b>	13	14.9
Neuroblastoma	4	4.6
Sarcoma de Ewing	5	5.7
Rabdomiosarcoma Embrionário	1	1.1
Seminoma Testicular	3	3.5
<b>Estadio da Doença ao Transplante</b>		
Remissão Completa (Primeira/Segunda)	33/12	37.9/13.8
Remissão Parcial	33	37.9
Sem Resposta/Progressiva	9	10.3
<b>Média de Terapias de Indução (Intervalo)</b>	2.5 (1-7)	
<b>Regimes de Condicionamento*</b>		
BEAM	32	36.8
BUMEL	10	11.5
MEL	40	46.0
CEC	3	3.5
FEAM	1	1.1
TBC	1	1.1
<b>Caraterísticas do Enxerto</b>		
CD34 <sup>+</sup> /Kg: Média (Interv.) x10 <sup>6</sup>	4.8 (2.0-16)	
<b>Evolução Clínica</b>		
Infeções Virais	18	20.7
Infeções Bacterianas	30	34.5
Infeções Fúngicas	19	21.8
<b>Doença primária dia +100</b>		
Remissão completa	22	25.3
Remissão	62	71.3
Recidiva**	3	3.5

**BEAM** - BCNU 300 mg/m<sup>2</sup> + Etoposideo 800 mg/m<sup>2</sup> + AraC 1600 mg/m<sup>2</sup> + Melfalano 140 mg/m<sup>2</sup>; **BUMEL** - Busulfano IV 12,8 mg/Kg + Melfalano 140 mg/m<sup>2</sup>; **MEL** - Melfalano 200 mg/m<sup>2</sup>; **FEAM** - Fotomustina 300 mg/m<sup>2</sup> + Etoposideo 800 mg/m<sup>2</sup> + AraC 1600 mg/m<sup>2</sup> + Melfalano 140 mg/m<sup>2</sup>; **CEC** - Carboplatinum 1400 mg/m<sup>2</sup> + Etoposideo 1400 mg/m<sup>2</sup> + Ciclofosfamida 6400 mg/m<sup>2</sup>; **TBC** - Tiopeta 750 mg/m<sup>2</sup> + Busulfano IV 9,6 mg/kg + Ciclofosfamida 120 mg/kg. \*\* as 3 recidivas após o transplante incidiram somente sobre os doentes com Sarcoma de Ewing.

### 3.1.2. Transplantes Alogénicos

Durante o período de Janeiro de 2010 a Junho de 2013, foram referenciados para este estudo 66 doentes submetidos a aloTCE com dador relacionado (27 doentes, 40,9%) e com dador não-relacionado (39 doentes, 59.1%) na Unidade de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil (IPOLFG). O estudo teve autorização do Gabinete de Investigação Clínica e da Comissão de Ética do IPOLFG. Foi obtido consentimento informado de todos os doentes participantes no estudo ou dos seus responsáveis legais.

Da população inicial foram excluídos 3 doentes, por falha de enxerto, verificada por análise de quimerismo celular (0% de células com origem no dador no sangue periférico ou nas diferentes linhagens celulares) e 1 doente por recidiva refratária da doença primária (leucemia linfoblástica aguda)

Os detalhes do grupo de 62 doentes que constitui a população final do estudo em

relação às características das doenças primárias, regimes de condicionamento, características dos enxertos, dos regimes profiláticos de rejeição e GVHD estão sumarizados na tabela 4.

**Tabela 4 – Características clínicas e evolução da população de doentes submetidas a transplante alogénico de células estaminais hematopoéticas.**

	n	%
<b>Doentes</b>	62	
<b>Idade, anos (Média, Intervalo)</b>	26 (3 - 66)	
<b>Sexo: Masc./Femin.</b>	37/25	59.7/40.3
<b>Doença Primária</b>		
Maligna	43	69.3
Síndromas Aplásicos	10	16.1
Deficiências Genéticas Hematopoiese	9	14.5
<b>Estadio da Doença ao Transplante</b>		
Remissão completa (1 <sup>a</sup> /2 <sup>a</sup> /3 <sup>a</sup> )	26/8/1	41.9/12.9/1.6
Remissão parcial	4	6.4
Sem resposta/Progressiva	2	3.2
<b>Média de Terapias de Indução (Intervalo)</b>	2.5 (1 - 7)	
<b>Regimes de Condicionamento</b>		
<b>Mieloablativo</b>	62	100
Com Irradiação Corporal Total	11	17.7
Com ATG	35	56.4
Outros	16	25.8
<b>Caraterísticas do Enxerto</b>		
PBSCs	42	67.7
CD34 <sup>+</sup> /Kg: Mediana (Interv.) x10 <sup>6</sup>	2.8 (0.1 - 8.7)	
CD3 <sup>+</sup> /Kg: Mediana (Interv.) x10 <sup>6</sup>	34.1 (11.5 - 81.2)	
MO	20	32.2
CD34 <sup>+</sup> /Kg: Média (Interv.) x10 <sup>6</sup>	4.8 (2.4 - 32.0)	
CD3 <sup>+</sup> /Kg: Média (Interv.) x10 <sup>6</sup>	194.0 (14.2 - 468.0)	
Dador Relacionado HLA Idêntico	26	41.9
Dador Não-Relacionado	36	58.1
Disparidade HLA classe I grupo	7	11.3
Disparidade HLA classe I alelo	5	8.1
Disparidade HLA classe II grupo	0	0
Disparidade HLA classe II alelo	2	3.2
<b>Profilaxia GVHD</b>		
Com FK506+MTX	34	54.8
Com CsA	28	45.2
<b>Evolução Clínica</b>		
aGvHD grau I-II	13	20.9
aGvHD grau IV	2	3.2
cGvHD	4	6.4
Infeções Virais **	44	71.0
Infeções Bacterianas	34	54.8
Infeções Fúngicas	27	43.5
<b>Quimerismo 3 meses*** (% Dador, Interv.)</b>		
Sangue Periférico (n=21)	97 (92 -100)	
CD33+ cells (n=41)	100 (99-100)	
CD3+ cells (n=41)	75 (26 - 96)	

<b>Quimerismo 6 meses*** (% Dador, Interv.)</b>		
Sangue Periférico (n=19)		99 (80-100)
CD33+ (n=30)		100 (93-100)
CD3+ (n=30)		74 (63-93)
<b>Doença primária dia +100</b>		
Remissão	46	74.2
Recidiva sensitiva	16	25.8

**ATG** – Ig anti-timócito; **PBSCs** – células estaminais mobilizadas; **MO** – medula óssea; **MTX** – Metotrexato; **CsA** - Ciclosporina A; **aGvHD** – doença de enxerto contra hospedeiro aguda; **cGvHD** – doença de enxerto contra hospedeiro crónica. \*Infeções CMV, EBV, BKV e HHV6. \*\*\* Quimerismo, % células com genótipo do dador (mediana, intervalo interquartis)

Aos doentes e respetivos dadores referenciados foi colhida uma amostra de sangue periférico pré-transplante, para isolamento de DNA genómico e genotipagem dos *loci* KIR. Aos 3, 6 e 12 meses pós-transplante foram colhidas amostras de sangue periférico dos doentes, para os estudos de cinética da recuperação hematológica e reconstituição imunológica, e avaliação do impacto dos diversos fatores clínicos.

### 3.1.3. População Controlo

Foram recrutados após consentimento informado, um total de 34 indivíduos como grupo controlo do estudo. Este grupo de indivíduos apresenta distribuições das características demográficas próximas das duas populações de doentes do estudo. Em relação à idade, o grupo de doentes autoTCE apresenta uma média de 50 anos (intervalo, 2 – 68), o grupo aloTCE 26 anos (intervalo, 3 – 66) anos e o grupo controlo 36 anos (intervalo, 23 – 66) anos (autoTCE vs. controlos, P=0.09 e aloTCE vs. controlos P=0.06). Em relação à comparação por género, também não existem diferenças significativas na distribuição de indivíduos masculinos e femininos na população autoTCE e o grupo controlo (50.6/49.4% vs. 41.2/64.7%, respetivamente; P=0.42) e a população submetida a aloTCE e o mesmo grupo controlo (59.7/40.3% vs. 41.2/64.7%; P=0.09). Na tabela 5 são sumarizadas as características da população controlo.

Os indivíduos do grupo controlo foram analisados em relação aos vários parâmetros de caracterização das várias populações celulares do estudo. O intervalo normal das contagens absolutas, ou frequências de cada população celular, é expresso como os percentis 10 e 90 da população controlo. Os doentes são considerados como tendo recuperado uma determinada população celular, se apresentam uma contagem absoluta de células, superior ao valor de percentil 10, da mesma população de células, no grupo controlo.

Tabela 5 – Características população de indivíduos controlo

	n	%
<b>Controlos</b>	34	
<b>Idade, anos (Média, Intervalo)</b>		36 (23 a 66)
<b>Sexo: Masc./Femin.</b>	14/20	41.2/64.7
<b>Origem Caucasiana Ocidental (Portuguesa)</b>	34	100

### 3.2. Análise Hematológica

A contagem completa com diferencial dos elementos do sangue periférico dos doentes e controlos foi feita com o analisador hematológico automatizado *Sysmex XT1800i* (Sysmex Europe, GmbH, Hamburgo, Alemanha).

### 3.3. Citometria de Fluxo e Separação de Populações Celulares por *FACS Cell-Sorting*

As amostras de sangue periférico dos doentes e controlos foram colhidas em K<sub>2</sub>EDTA e processadas para imunofenotipagem celular, com o seguinte painel de anticorpos monoclonais anti-humano com marcação fluorescente: CD2-APC (clone S5.2), CD3-FITC (clone UCHT1), CD4-PECy7 (clone SK3), CD5-APC (clone UCHT2), CD8-APC (clone RPA-T8), CD14-PE (clone M5E2), CD16-PE (3G8), CD19-PECy7 (clone SJ25C1), CD24-FITC (clone ML5), CD27-PE (clone M-T271), CD28-PE (clone CD28.2), CD38-PE (clone HB7), CD45-FITC (HI30), CD45RA-APC (clone HI100), CD56-PECy7 (clone 159), IgM-FITC (clone G20-127), HLA-DR-PE (clone G46-6); todos reagentes da *BD Pharmigen* (BD Biosciences, San Jose, CA). Os volumes de anticorpos especificados pelo fabricante foram incubados durante 30 min. com 100 µl de sangue periférico. O sangue a marcar com anti-IgM foi submetido previamente a uma lavagem, os 100 µl de sangue periférico foram lavados em 3 ml de 1x tampão fosfato salino (PBS), pH=7.2 (Life Technologies, Carlsbad, CA) e centrifugados 5 min. a 300 xg. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspendidas no volume final de 100-150 µl de PBS a que se adicionou a combinação de anticorpos para definir as várias subpopulações leucocitárias do sangue periférico. A lise dos eritrócitos foi realizada adicionando 2 ml de 1X *FACS Lysing Solution* (BD BioSciences) e incubou-se por 10 min. à TA. As amostras foram centrifugadas a 300 xg por 5 min. O sobrenadante foi decantado e as células foram ressuspendidas em 400 µl de 1x PBS, pH=7.2. As suspensões celulares marcadas foram adquiridas de imediato num citómetro de fluxo de *BD FACS Calibur* (BD BioSciences). Foram adquiridos um mínimo de 50 000 eventos com exceção das marcações de células B onde foram adquiridos 100 000 eventos. Adicionalmente, para cada amostra, foi feito um controlo

com os anticorpos monoclonais isotípicos IgG2a-PE (clone G155-178), IgG1-FITC (clone MOPC-21) e IgG1-APC (clone MOPC-21) (todos, BD Biosciences) para definir a marcação fluorescente inespecífica.

A análise de células T CD4<sup>+</sup> emigrantes recentes do timo, foi realizada com o sistema CD4<sup>+</sup> *Recent Thymic Emigrant Enumeration Kit* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, para cada amostra, foram preparados dois tubos com 100 µl de sangue, ao primeiro foram adicionados 20 µl da solução de monoclonais de classificação, ao segundo 20 µl da solução de monoclonais isotípicos para controlo. As amostras foram incubadas 10 min. a 4°C, após o que se adicionou 4 ml de 1x solução de lise de eritrócitos, que incubou mais 10 min. à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados 5 min. a 300 xg, o sobrenadante decantado e as células ressuspensas em 300 µl de PBS, 0.5% de albumina sérica bovina (BSA) (Life Technologies, Carlsbad, CA e 0.01% de azida sódica. Foram adicionados 150 µl de solução de fixação às suspensões celulares, que foram de imediato analisadas no *FACS Calibur* (BD BioSciences), tendo sido adquiridos, um mínimo de 100 000 eventos.

A análise dos dados de citometria de fluxo foi realizada no software *FlowJo v9.8.2* (TreeStar, Ashland, OR). Desta forma, a análise das fluorescências das diferentes combinações de anticorpos monoclonais permitiram identificar os vários perfis fenotípicos celulares e estabelecer os *gates* electrónicos que indicam a frequência das populações celulares de seleccionadas. Os valores absolutos das diversas contagens celulares, foram calculados através do produto das frequências celulares obtidas pelo valor da contagem de linfócitos/µl de sangue periférico. Este último fator é derivado da análise hematológica já descrita.

De forma a avaliar a tomada e acomodação do enxerto e o desenvolvimento hematopoiético no pós-transplante alogénico, foi feita a análise de quimerismo celular em subpopulações celulares representativas da mielopoiese, da linfopoiese, das células T e das células estaminais e progenitoras CD34<sup>+</sup>. As suspensões de células CD33<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup> foram preparadas a partir de sangue periférico (somente as três primeiras populações) ou aspirado de sangue medular, por citometria de fluxo com separação celular (FACS cell-sorting). As amostras (3-5 ml de sangue periférico ou medular colhido em K<sub>2</sub>EDTA) começaram por ser centrifugadas a 600 xg durante 10 min. à TA, foi retirado o anel leucocitário (buffy-coat) e adicionado 10 ml de solução de lise de eritrócitos (SLE) 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA-2Na, pH=7.2. O preparado foi incubado durante 10 min. à TA e centrifugado a 300 xg por 5

min. O sobrenadante foi decantado e o sedimento de células foi ressuspenso em 200  $\mu$ l de PBS. Os seguintes anticorpos monoclonais anti-humano foram usados para a marcação das células do sangue periférico: CD3-FITC (clone Cris-7), CD56-PE (clone C5.9) (ambos, Cytognos, Salamanca, Espanha) e CD33-APC (clone P67.6) (BD BioSciences). Para a marcação das células do sangue medular foram usados os seguintes anticorpos: CD3-PerCP-Cy5.5 (clone SK7), CD33-APC (clone P67.6), CD34-PE (clone 8G12), CD45-FITC (clone 2D1) (todos, BD BioSciences) e CD56-PC7 (clone N901/NKH-1) (Beckman-Coulter/Immunotech, Marselha, França). As quantidades recomendadas pelos fabricantes de anticorpos, foram adicionadas às suspensões celulares e incubaram durante 20 min. à TA. No final, foi adicionado 2 ml de PBS às suspensões celulares, centrifugou-se a 300 xg durante 5 min., decantou-se o sobrenadante e ressusponderam-se as células em 500  $\mu$ l de PBS com 0.5% de BSA. Esta suspensão celular foi passada num filtro *Cell Strainer* (BD BioSciences) e adquirida num sistema *BD FACSAria* (BD BioSciences). Com esta metodologia foram adquiridas, para cada população celular, as seguintes quantidades de células (mediana, intervalo de interquartis) com as purezas seguintes (mediana, máximo-mínimo): CD33<sup>+</sup>,  $1.1 \times 10^6$ , (0.57-1.8) células com 99,5% (95.4-99.7) de pureza; CD3<sup>+</sup>,  $3.0 \times 10^5$ , (0.1-6.0) células com 99.2% (90-100) de pureza; CD56<sup>+</sup>,  $5.1 \times 10^4$  (3-6.1) células com 99% (92-100) de pureza e CD34<sup>+</sup>,  $7.8 \times 10^4$  (4.6-17.0) células com 99,8% (90.5-99.8) de pureza.

### 3.4. Isolamento Magnético de Populações Celulares

De forma a obter suspensões celulares enriquecidas em células T CD4<sup>+</sup> e em T CD8<sup>+</sup> foi usado o sistema de seleção magnética *EasySep Human CD4 Selection Kit* (StemCell Technologies, Grenoble, França). O procedimento consistiu na preparação de células mononucleares de 5 ml de sangue periférico em K<sub>2</sub>EDTA por separação por gradiente de densidade por centrifugação em meio *Lymphoprep* (Axis-Shield PoC, Oslo, Noruega) a 900 xg por 20 minutos à temperatura ambiente (TA). A banda de células mononucleares foi colhida por aspiração, lavada 2 vezes com PBS e ressuspenso em PBS suplementado com 2% de soro de vitela fetal (FBS) (Life Technologies, Carlsbad, CA). Foram adicionados à suspensão celular 100  $\mu$ l da solução *EasySep* para seleção positiva de células CD4<sup>+</sup>. Passados 15 minutos (min.) de incubação à TA foram adicionados 50  $\mu$ l de partículas magnéticas *EasySep* à preparação, que foi misturada e incubou outros 10 min. O tubo contendo a preparação foi colocado num suporte *EasySep Magnet* (StemCell Technologies), durante 5 min., o que possibilita a retenção das células CD4<sup>+</sup> marcadas magneticamente. Com a

inversão do tubo, ainda sob o campo magnético, é recolhido o sobrenadante como uma fração celular depletada de células T CD4<sup>+</sup> que contém células T CD8<sup>+</sup>, células B, NK e monócitos. As células retidas na parede do tubo são ressuspensas em 1 ml de PBS com 2% de FBS e recolhidas como uma suspensão celular de células T CD4<sup>+</sup> enriquecidas >90%.

A separação de células NK foi realizada com o sistema *EasySep NK Cell Enrichment Kit* (StemCell Technologies). O procedimento é muito semelhante ao já descrito para a preparação das frações celulares T. Com este sistema é feito uma seleção negativa CD56, pelo que a fração enriquecida em células NK CD56<sup>+</sup> consiste no sobrenadante após a separação magnética.

Ambas as suspensões celulares quer as enriquecidas e quer as depletadas em células T CD4<sup>+</sup> e também as suspensões de células NK foram centrifugadas para formar um precipitado de células para extração do RNA total.

### 3.5. Extração de DNA, RNA e Transcrição reversa

Foi isolado DNA genómico do *buffy-coat* de 1 ml de sangue pré-transplante dos doentes e dadores com o sistema *Qiamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). O procedimento foi feito de acordo com as especificações do fabricante com algumas variações. Numa descrição breve, foi colocado 1 ml de sangue num tubo *ependorf* de 2 ml, que foi centrifugado 3 min. à TA a 1000 xg. A fração de leucócitos que se formou sob o plasma (*buffy-coat*) foi colhida num volume aproximado de 200 µl. As células foram lisadas, o crude celular foi carregado numa coluna de afinidade, centrifugado e submetido a lavagens sequenciais, conforme o procedimento recomendado. O DNA retido na coluna foi eluído num volume de 100 µl de H<sub>2</sub>O *MilliQ* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Esta solução de DNA foi usada para a genotipagem HLA e KIR.

Para a extração de DNA das suspensões celulares isoladas por citometria de fluxo com *cell-sorting* para análise do quimerismo celular, foi seguido um procedimento semelhante com um ajuste na eluição. O volume de eluição do DNA na coluna foi de 25 µl e a operação de eluição foi repetida 3 vezes, com a mesma solução, de forma a maximizar a eficiência da recuperação do DNA.

Para a quantificação de sjTRECs e sjKRECs, o DNA das amostras dos doentes no pós-transplante foi isolado com um método de precipitação seletiva usando o sistema *DNAzol Reagent* (Life Technologies). Em breve, os eritrócitos de 2 ml de sangue periférico foram lisados por uma incubação com 5 ml de SLE durante 10 min. à TA. Seguiu-se uma centrifugação a 600 xg por 5 min., foi decantado o sobrenadante e o

sedimento de células foi ressuspenso em 10 ml de SLE. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. O sedimento de células limpo foi homogeneizado em 1 ml de DNAzol até à lise completa, após o que se adicionou 500 µl de etanol absoluto. Com a inversão da solução, formou-se normalmente um precipitado de DNA que ou pôde ser retido na parede do tubo, enquanto decantado, ou caso contrário, o tubo foi centrifugado a 4000 xg por 5 min., de forma a sedimentar o DNA. O DNA precipitado foi lavado duas vezes por inversão com 1 ml de 75% (v/v) etanol após o que se retirou a totalidade do etanol. O DNA foi solubilizado em 100 a 200 µl de 8 mM NaOH em função da dimensão do precipitado de DNA. A solução de DNA foi neutralizado com 2.5 µl de 1 M HEPES por cada 100 µl de 8 mM NaOH adicionados. O DNA foi quantificado por absorvância a 260 nm e ajustada a concentração a 25 ng/µl. Este processo de isolamento de DNA, garante a máxima eficiência na obtenção dos pequenos fragmentos de círculos de DNA, que constituem os sjTRECs e os sjKRECs. A extração de RNA total das frações celulares enriquecidas em células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e NK com o sistema EasySep foi feita com o sistema *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) de acordo com as instruções estandardizadas. O RNA foi eluído da coluna de afinidade com 20 µl de H<sub>2</sub>O livre de nucleases.

O RNA celular total isolado foi convertido a DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa com o sistema *Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Aos 20 µl de RNA celular foram adicionados os seguintes volumes dos componentes do kit: 1.5 µl de tampão de hibridização (*annealing buffer*), 1.5 µl de oligonucleótidos iniciadores (primers) aleatórios (*random hexamers*) e 1.5 µl de primers oligo(dT) ((dT)<sub>20</sub>). O emparelhamento dos primers foi feito com uma incubação durante 5 min. a 65°C num termociclador *GeneAmp 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA) e depois 3 min. em gelo. De seguida, foi adicionado 15 µl de solução de reação (*2x First-Strand Reaction Mix*) e 5 µl de mistura enzimática (*Superscript III/RNaseOut Enzyme Mix*). A mistura foi homogeneizada e incubada num termociclador sob o seguinte perfil de temperaturas: 25°C, 5min.; 50°C, 50 min.; 85°C, 5 min.; e 4°C, 10 min. O cDNA foi conservado a -20°C até ao processamento.

### 3.6. Quantificação de sjTRECs e sjKRECs

Um ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi usado para a quantificação das sequências TREC e KREC em sangue periférico. As sequências de nucleótidos dos primers e das sondas de fluorescência por hidrólise (sondas Taqman) usados estão descritas na literatura (tabela 6). A única modificação efetuada, foi a marcação com outro fluoróforo (JOE), adequado às calibrações espectrais disponíveis no

sistema de qPCR ABI 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizado nestes ensaios.

**Tabela 6 – Sequências nucleotídicas dos primers e sondas fluorescentes para os ensaios de quantificação por qPCR da sequência de normalização TRAC, dos sjTRECs, dos sjKRECs e da sequência cjRSSKde.**

Oligonucleótido	Sequência	Refs.
<b>TRAC-fw</b>	TGG CCT AAC CCT GAT CCT CTT	[304]
<b>TRAC-rv</b>	GGA TTT AGA GTC TCT CAG CTG GTA CAC	[304]
<b>TRAC-prob</b>	<b>JOE-TCC CAC AGA TAT CCA GAA CCC TGA CCC-TAMRA</b>	[304]
<b>TREC-fw</b>	CAC ATC CCT TTC AAC CAT GCT	[305]
<b>TREC-rv</b>	TGC AGG TGC CTA TGC ATC A	[304]
<b>TREC-prob</b>	<b>FAM-ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT-TAMRA</b>	[304]
<b>KRECs-fw</b>	TCC CTT AGT GGC ATT ATT TGT ATC ACT	[304]
<b>KRECs-rv</b>	AGG AGC CAG CTC TTA CCC TAG AGT	[304]
<b>KREC-prob</b>	<b>JOE-TCT GCA CGG GCA GCA GGT TGG-TAMRA</b>	[304]
<b>RSSKde-fw</b>	CCC GAT TAA TGC TGC CGT AG	[208]
<b>RSSKde-rv</b>	CCT AGG GAG CAG GGA GGC TT	[208]
<b>RSSKde-prob</b>	<b>JOE-AGC TGC ATT TTT GCC ATA TCC ACT ATT TGG AGT-TAMRA</b>	[208]

**fw** – primer direto; **rv** – primer reverso; **prob** – sonda de hidrólise Taqman; **FAM** – 6-carboxifluoresceína; **TAMRA** – tetrametilrodamina; **JOE** – 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína

Para cada amostra foram estabelecidas duas análises de qPCR. A primeira amplifica uma sequência de normalização (TRAC, sequência da região constante do gene *TRA*) do número de células nucleadas na reação. A segunda é uma reação composta, que amplifica simultaneamente as sequências dos sinais de junção dos TRECs e dos KRECs (sjTREC e sjKREC respetivamente), distinguidas pelos sinais de fluorescência FAM e JOE, respetivamente.

Para as reações usou-se 125 ng de DNA (isolado com DNazol), 1x *Taqman Universal Master Mix II* (Applied Biosystems), 900 nM dos primers direto e reverso e 250 nM das sondas, num volume final de 25 µl. A PCR foi feita com 45 ciclos de duas temperaturas 95°C, 10 segundos, 60°C, 1 min.; com a leitura de fluorescência durante a extensão a 60°C. O número de cópias de cada uma das três sequências foi extrapolado a partir de curvas padrão estabelecidas a partir da diluição logarítmica seriada ( $10^6$  até 10 cópias) de um plasmídeo linearizado, com inserções dos fragmentos TRAC, TREC e KREC numa razão de 1:1:1 [304, 306]. O plasmídeo foi diluído numa solução contendo 310 ng/µl de *RNA poli-A* (Qiagen), cujo efeito é minimizar a adsorção do DNA plasmídeo aos tubos e pontas de pipeta, melhorando significativamente a reprodutibilidade do ensaio.

Este plasmídeo com a inserção tripla foi generosamente cedido pela Dra. Luisa Imberti do Spedali Civili di Brescia, Itália, foi expandido no laboratório da Prof. Isabel Sá Correia do IST, Lisboa, Portugal, purificado e linearizado no laboratório da Paula Videira da FCMUNL, Lisboa, Portugal e finalmente quantificado e aliquoteado nas diluições  $10^6$  a 100 cópias, sendo a diluição de 10 cópias preparada na altura do

ensaio.

Todas as reações de PCR foram efetuadas em triplicado e usado o valor mediano das quantidades obtidas. Os 3 ensaios de qPCR apresentaram uma eficiência superior a 95% avaliada pelos declives das retas da regressão linear (declive TRAC,  $-3.335 \pm 0.084$ ; declive sjTRECs,  $-3.405 \pm 0.055$ ; declive sjKRECs,  $-3.412 \pm 0.051$ ).

O número de células no sangue periférico contendo sjTRECs e sjKRECs foi obtido com a seguinte expressão [304, 307]:

$$\mathbf{N^\circ \text{ células com TRECS ou KRECS}/\mu\text{l sangue} = (\mathbf{N^\circ \text{ médio de cópias TREC ou KREC}} / (\mathbf{N^\circ \text{ médio de cópias TRAC}}/2)) \times \mathbf{N^\circ \text{ leucócitos}/\mu\text{l sangue}}$$

Finalmente foi estimado o número de divisões das células B periféricas conforme o método descrito [177, 308]. As sequências cjrSSKde, que resultam da deleção do rearranjo do loci *IGK* e que permanecem no DNA somático, foram quantificadas por qPCR usando os primers e sonda descritos na tabela 8 nas mesmas condições dos ensaios já descritos. A diferença entre o ciclo de detecção (Ct) da quantificação dos sjKRECs para o Ct da quantificação do cjrSSKde representa uma estimativa das divisões que a população de células B da amostra em análise fez.

### **3.7. Análise da Diversidade do CDR3 do *TRB* em Células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>**

Foi analisada a diversidade da região determinante da complementaridade (CDR3) da cadeia  $\beta$  do TCR (TCRB). Desta forma, é possível apreciar qualitativamente o repertório estrutural dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> avaliando a ausência e/ou a expansão de populações celulares clonotípicas, [309].

A metodologia usada implica a amplificação por PCR dos segmentos *TRVB-TRCB* com oligonucleótidos específicos para cada uma das famílias *TRVB*, a partir do cDNA derivado de RNA isolado de células T. O produto de amplificação é um segmento de DNA que contém os rearranjos VDJ do CDR3 expressos pelas células T. O produto desta reação é submetido a uma reação de extensão com um oligonucleótido comum, marcado com o fluorocromo fluoresceína (FAM). Os fragmentos de DNA resultantes dessa reação são separados por eletroforese capilar (CE). Da análise dos electroferogramas é possível calcular o tamanho (em pares de bases) dos diferentes fragmentos (picos) de CDR3, o número de picos de CDR3 analisar a clonalidade e distribuição (gaussiana ou não-gaussiana) dos picos na região CDR3, parâmetros que constituem a análise conhecida como *spectratyping* [309].

**Tabela 7 – Sequências dos oligonucleótidos usados para a análise da diversidade do repertório TRB.**

Família VB	Sequências	Alelos <i>TRVB</i> *	Refs.
<b>VB1</b>	CCG CAC AAC AGT TCC CTG ACT TGC	TRBV9*01/02/3	[310]
<b>VB2</b>	GGC CAC ATA CGA GCA AGG CGT CGA	TRBV20-1*03/04/05/06/07	[310]
<b>VB3</b>	CGC TTC TCC CTG ATT CTG GAG TCC	TRBV28*01	[310]
<b>VB4</b>	TTC CCA TCA GCC GCC CAA ACC TAA	TRBV29-1*01/02/03	[310]
<b>VB5</b>	AGC TCT GAG CTG AAT GTG AAC GCC	TRBV5-5*03, 5-6*01, 5-7*01, 5-8*01/02	[310]
<b>VB6</b>	CTC TGA AGA TCC AGC GCA CA(C/G) AGC	TRBV7-8*01/03, 7-3*02/03/04/05, 7-4*01	**
<b>VB7</b>	CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT CTC	TRBV4-1*01/02	[310]
<b>VB8</b>	CCA TGA TGC GGG GAC TGG AGT TGC	TRBV12-3*01,12-4*01/2	[310]
<b>VB9</b>	CCT AAA TCT CCA GAC AAA GC	TRBV3-1*01/02	[311]
<b>VB11</b>	TGC CAG GCC CTC ACA TAC CTC TCA	TRBV25-1*01	[310]
<b>VB12</b>	AAA GGA GAA GTC TCA GAT	TRBV10-1*02, 10-3*01/02/03/04	[312]
<b>VB13</b>	CAC TGC AGT GT(A/G) CCC AGG ATA TGA	TRBV6-6*01/04/05, 6-8*01, 6-9*01	**
<b>VB14</b>	GGG CTG GGC TTA AGG CAG ATC TAC	TRBV27*01	[310]
<b>VB15</b>	CAG GCA CAG GCT AAA TTC TCC CTG	TRBV24-1*01	[310]
<b>VB16</b>	GCC TGC AGA ACT GGA GGA TTC TGG	TRBV14*01/02	[310]
<b>VB17</b>	TCC TCT CAC TGT GAC ATC GGC CCA	TRBV19*01/02/03	[313]
<b>VB18</b>	CTG CTG AAT TTC CCA AAG AGG GCC	TRBV18*01	[313]
<b>VB20</b>	AGC TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC	TRBV30*01/02/04/05	[312]
<b>VB21</b>	TCC AGC CTG CAA AGC TTG (A/G)G(A/G) ACT	TRBV11-1*01, TRBV11-2*01/02/03, 11-3*01/02/03	**
<b>VB22</b>	AAA GAG GGA AAC AGC CAC TCT G	TRBV13*01/02	[314]
<b>VB23</b>	CGC TGT GTC CCC ATC TCT AAT C	TRBV2*01/02/03	[314]
<b>VB24</b>	CAG TGA CCC TGA GTT GTT CTC A	TRBV15*01/02/03	[314]
<b>CB1</b>	CGG GCT GCT CCT TGA GGG GCT GCG		[310]
<b>CB2</b>	<b>FAM-CAC AGC GAC CTC GGG TGG G</b>		[313]

\*A homologia das sequências nucleotídicas dos primers foi revista com a ferramenta IMGT/V-Quest ([http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/)) [315, 316] de forma a identificar os alelos *TRVB* amplificados.

\*\*Os primers VB6, VB13 e VB21 foram modificados de forma a apresentarem homologia completa com todos os alelos de cada uma destas famílias *TRVB*.

Para cada amostra foram preparadas 22 reações de PCR, cada uma combinando 0.3 mM de um primer com homologia específica para os alelos de cada uma das famílias de segmentos *TRVB* funcionais (VB1 a VB24) com 0.3 mM de um primer CB1 localizado no segmento constante do gene (as sequências e especificidades dos primers estão listados na tabela 7). A cada uma das reações foi adicionado 0.5 µl de

cDNA isolado das frações celulares enriquecidas e depletadas de células T CD4+ (que a partir de agora, no contexto da análise do CDR3 do *TRB* serão denominadas de fração T CD4+ e T CD8+). Os restantes componentes para cada reação de PCR foram, 1x tampão de PCR (Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 uM *DNTP's* (Promega, Madison, WI) e 2 UI de *Taq Platinum* (Invitrogen) num volume de reação total de 25 µl. O perfil térmico do PCR consistiu em 95°C por 5 min., 40 ciclos de 95°C por 15 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. e finalmente uma extensão final de 72°C por 30 min. num termociclador GeneAmp 9700.

As reações de extensão usaram 0.2 µM do oligonucleótido CB2 marcado com FAM, 3 µl de cada um dos 22 produtos amplificados, 0.5 x de tampão de PCR, 0.75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 uM *DNTP's* e 1 UI de *Taq Platinum*, num volume final de 10 µl. O 'run-off' foi feito com o seguinte perfil térmico, 95°C 2min., 10 ciclos de 95°C por 15 seg., 55°C por 30 seg. e 72°C por 30 min. e finalmente uma extensão final de 72°C por 30 min. num termociclador GeneAmp 9700.

Os produtos fluorescentes obtidos foram preparados para a eletroforese capilar (CE) que usou 3 µl de cada reação, 5 µl de formamida desionizada (Applied Biosystems) e 0.2 µl do marcador de migração e dimensão dos fragmentos GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) desnaturados por 3 min. a 95°C e incubados 5 min. no gelo. Os fragmentos de DNA foram injetados em condições 'standard' num sistema de CE ABI 3130XL Genetics Analyzer (Applied Biosystems) usando o polímero de separação POP7 (Applied Biosystems). Os electroferogramas obtidos foram analisados no software de análise de fragmentos GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) para a aquisição dos parâmetros da análise de *spectratyping*.

O *spectratype* de cada família TRVB foi classificado em relação aos seguintes fatores:

- número de picos que se contíguos têm de estar espaçados 3 bases
- forma da distribuição Gaussiana ou não
- ausência de picos intermédios ou na distribuição de fragmentos
- frequência de cada pico de CDR3 de cada família TRVB calculada como:

$$\%VB_n = (\text{área pico } VB_n / \Sigma \text{área todos } VB) \times 100$$

- frequência total de cada família VB calculada como:

$$\%VB \text{ total} = (\Sigma \text{área todos picos } VB_n / \Sigma \text{área todos } VB) \times 100$$

Com base nestes parâmetros, foi adotada uma classificação qualitativa do perfil de distribuição das dimensões do CDR3 das várias famílias de segmentos TRVB; adaptando as metodologias de referências anteriores [309, 317-319]. Esta

classificação exposta na tabela 8, é indicativa da diversidade e complexidade do repertório clonotípico T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> circulante, dos doentes no pós-transplante.

**Tabela 8 – Classificação dos ‘spectratypes’ obtidos para as várias famílias TRVB**

Classificação	Perfil	Formato do Spectratype
PG	Policlonal Gaussiano	6-10 picos separados de 3bp com picos dominantes ao centro da distribuição
PS	Policlonal Distorcida	5 picos ou mais de 3 ausências de picos internos ou 1 pico superior a 40% da área total
PSS	Policlonal Severamente Distorcida	5 picos ou mais com 1 ou 2 picos superiores a 75% da área total
OL	Oligoclonal	2 a 4 picos
M	Monoclonal	1 pico ou 1 pico ≥ 90% da área total
NE	Não expresso	

### 3.9. Análise da Diversidade do CDR3 *IGH* da IgM

A diversidade estrutural do repertório *IGH* expresso como IgM foi analisada, verificando a distribuição de fragmentos do CDR3 de cada família de segmentos *IGHV*, por um método de *spectratyping* semelhante aos processos já descritos para os genes *TRB*.

A partir do cDNA isolado da fração celular depletada de células T CD4<sup>+</sup>, foram amplificados por PCR, segmentos de DNA usando 0.5 mM dos primers específicos para cada família de segmentos *IGHV* (localizados na sequência nucleotídica que codifica o péptido líder) e do primer comum localizado no segmento *IGHM* (tabela 9). As condições das reações em termos de concentrações dos componentes da PCR e perfil térmico foram comuns ao descrito para análise do gene *TRB*.

**Tabela 9 – Sequências dos oligonucleótidos usados para a análise da diversidade do repertório *IGH*.**

Família <i>IGHV</i>	Sequências	Grupos Alélicos <i>IGHV</i> *	Refs.
VH1	CCA TGG ACT GGA CCT GGA	IGVH1-02, -03, -08, -18, -24,- 45, -46, -58, -69/D/2	[320]
VH2	ATG GAC ATA CTT TGT TCC AC	IGVH2-05, -26,- 70/D	[320]
VH3	GGG TCG ACT CCA TGG AGT TTG GGC TGA GC	IGVH3-07, -09, -11, -13, -15, -20, -21, 30-22/23/23D, -30-3/-5, 33, -43/D, -48,-49, -53, -64/D, -66, -72, -73, -74	[321]

<b>VH4</b>	ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT	IGVH4-4, -28, -1/2/4, -31, -34, -38-2, -39, -55, -59, -61	[320]
<b>VH5</b>	ATG GGG TCA ACC GCC ATC CT	IGVH5-10-1, -51	[320]
<b>VH6</b>	GGG TCG ACT GTC TCC TTC CTC ATC TTC CT	IGVH6-1	[321]
<b>Cu</b>	GGA ATT CTC ACA GGA GAC G		[321]
<b>VHFR3</b>	<b>FAM-ACA</b> CCG CCG TGT ATT ACT GT**		[322]

\*A homologia das sequências nucleotídicas dos primers foi revista com a ferramenta IMGT/V-Quest ([http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/)) [315, 316] de forma a identificar os grupos alélicos amplificados.

\*\*O primer de extensão VHFR3 foi modificado com a marcação FAM.

O primer de extensão com marcação fluorescente FAM, usado na reação de 'run-off' (realizada nas condições já descritas), está localizado numa região não polimórfica das várias famílias de segmentos *IGHV*, definida como 'framework3'. Com esta reação, são obtidos fragmentos de DNA, representativos da diversidade estrutural do gene *IGH*, originada na recombinação somática do desenvolvimento das células B. A classificação da diversidade do repertório *IGH* nos doentes pós-transplante, foi definida tal como expresso na tabela 10.

**Tabela 10 – Classificação dos 'spectratypes' obtidos para as várias famílias *IGHV***

Classificação	Perfil	Formato do Spectratype
<b>PG</b>	Policlonal Gaussiano	>15 picos separados de 3bp com picos dominantes ao centro da distribuição
<b>PS</b>	Policlonal Distorcida	de 8 a 14 picos, ou mais de 5 ausências de picos internos
<b>PSS</b>	Policlonal severamente Distorcida	de 8 a 14 picos com 1 pico superior a 40% da área total ou 2 picos superiores a 75 % da área total
<b>OL</b>	Oligoclonal	de 2 a 8 picos
<b>M</b>	Monoclonal	1 pico ou 1 pico ≥ 90% da área total
<b>NE</b>	Não expresso	

### 3.10. Genotipagem e Análise de Transcritos KIR

O repertório genómico dos recetores KIR das células NK dos controlos, dos doentes no pré-transplante e dos doadores de CEHs, foi genotipado com o sistema KIR SSO Genotyping Test (One Lambda, Canoga Park, CA). No processo foram seguidas as instruções do fabricante. Em breve, para cada amostra, foram preparadas 3 reações de PCR com 4 µl dos grupos de primers biotinilados P01, P02, e P03, que produzem

respetivamente amplificados dos exões 3+4, o exão 5 e os exões 7-9 dos genes KIR. A cada reação foram adicionados 40-50 ng de DNA, 13.8 µl de D-Mix (One Lambda) e 2.5 UI de Amplitaq polimerase (LifeTechnologies, Carlsbad, CA), num volume final de 20 µl de reação. A PCR foi feita num termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) com o perfil térmico e tempos de incubação descritos no protocolo do fabricante. De seguida, procedeu-se à hibridização dos produtos de PCR com as populações de esferas Xmap (Luminex, Austin, Texas). Cada população destas esferas, está revestida com uma sonda de oligonucleótidos de sequência específica para um gene KIR. Foram retirados 10 µl de cada produto de PCR para um microtubo, desnaturados com 3.0 µl de solução de desnaturação DB (One Lambda) por 10 min. à TA e neutralizados com 5 µl de solução de neutralização NB (One Lambda) em gelo. Foram adicionados 38 µl de uma diluição das misturas de esferas S01, S02 e S03, diluídas em solução de hibridização (na relação 4 µl de esferas + 34 µl de solução de hibridização) aos produtos de amplificação produzidos com os primers P01, P02 e P03. A hibridização foi feita por 15 min. a 60°C, após o que adicionou 100 µl de tampão de lavagem a cada reação e centrifugou-se a 1200xg por 5 min.. A lavagem foi repetida mais duas vezes após a decantação do sobrenadante. A formação do híbrido sonda – sequência amplificada KIR foi revelada usando o conjugado fluorescente estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) com afinidade pela biotina inserida nas cadeias dos produtos dos PCRs. Para isso, foram ressuspensos os precipitados de esferas em 50 µl de 1x SAPE (One Lambda), incubados 5 min. a 60°C e lavados uma vez nas condições descritas. Os produtos finais foram ressuspensos em 50 µl de solução de lavagem e adquiridos em condições standardizadas no analisador Luminex 100 (Luminex). O Luminex, classifica cada esfera como pertencente a uma das várias populações de esferas, com base no seu padrão interno de fluorescência, e em simultâneo, adquire a fluorescência específica da ficoeritrina indicadora da formação de um híbrido com sequência específica sonda-DNA teste. As leituras destes parâmetros foram exportadas para o software de análise HLA Fusion Research v3.2.0 (One Lambda). A interpretação dos padrões de hibridização dos produtos de PCR dos genes KIR, nestas condições, permite definir o genótipo individual KIR nos seguintes loci: *2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *3DS1*, *2DP1* e *3DP1*.

A expressão dos genes KIR foi avaliada com um método de PCR fluorescente previamente descrito [323] com algumas adaptações. A expressão dos genes KIR *2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3* e *2DS4* foi detetada, combinando 0.2 µM do primer direto 2Dfw marcado com FAM e dos primers reversos, com especificidade por

cada um destes genes (tabela 13). A expressão dos genes KIR *2DL4*, *2DL5*, *3DL1*, *3DL2* e *3DS1* foi definida usando combinações de 0,2  $\mu$ M do primer 2DL4/5-3DLfw com marcação FAM e dos primers reversos com sequências homólogas a cada um dos respectivos genes (tabela 11). A expressão do gene CD56 foi avaliada como controlo positivo do processo.

A cada mistura de primers, foi adicionada uma mistura reacional, contendo 0.35  $\mu$ l de cDNA (da fração celular enriquecida em células NK), 1x tampão GeneAmp PCR Buffer (Applied Biosystems), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de DNTP's e 2.5 UI de Amplitaq Gold (Applied Biosystems) num volume final de 25  $\mu$ l. Os PCRs foram feitos num termociclador GeneAmp 9700 programado com o seguinte perfil: 95°C, 10 min.; 40 ciclos 95°C 15 seg., 58°C 1 min. e uma extensão final a 72°C por 10min.

**Tabela 11 – Sequências dos oligonucleótidos usados para a análise da expressão dos genes KIR.**

Primers	Sequências	Genes KIR	Frag. (bp)	Refs.
2DL1rv	AGG GTC ACT GGG AGC TGA CAC	2DL1	327	[323]
2DL2rv	GGA CCG ATG GAG AAG TTG GCT	2DL2	242	[323]
2DL3rv	CTC TGT GCA GAA GGA AGT GCT G	2DL3	163	[323]
2DL4rv	ATA GAT GGT AGA TGT CAA AGG AGC TCT	2DL4	148	[323]
2DL5rv	AGC CTA GGT TCA TGG GCC C	2DL5	179	[323]
2DS1rv	GTC CCT GCC AGG TCT TGC T	2DS1	266	[323]
2DS2rv	CAA TGA GGT GCA AAG TGT CCT TAT	2DS2	196	[323]
2DS3rv	AGA GGG TCA CTG GGA GCT GAA	2DS3	329	[323]
2DS4rv	CTC TCC AAT GAG GTG CAA AGT GTT	2DS4	201	[323]
2DS5rv	CAA TGA GGC GCA AAG TGT G	2DS5	196	[323]
3DL1rv	GTA GGT CCC TGC AAG GGC AA	3DL1	261	[323]
3DL2rv	CCT GCA AGG ACA GGC ATC AA	3DL2	254	[323]
3DS1rv	AAG GGC ACG CAT CAT GGA	3DS1	249	[323]
CD56rv	TTC GCT GCT GAT GTT CCG	CD56	227	[323]
2Dfw	FAM-ATG GCG TGT GTT GGG TTC TTC			[323]
2DL4/5-3DLfw	FAM-GTG GTC GGC ACC CAG CAA			[323]
CD56fw	FAM-AGG TGG ATA AGA ACG ACG AGG			[323]

Finda a PCR, foi acrescentado o produto para um volume final de 50  $\mu$ l com H<sub>2</sub>O MilliQ

(Merck Millipore) . Foram desnaturados 3  $\mu$ l destas diluições com 5  $\mu$ l de formamida e 0.2  $\mu$ l do marcador de migração GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) nas condições anteriormente descritas. Os fragmentos foram separados por uma CE standard e os dados obtidos foram analisados no software de análise GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

### 3.11. Análise do Quimerismo Celular em Linhagens Celulares Hematopoiéticas

A análise do quimerismo celular, ou seja, a investigação da origem genotípica se dador se recetor, da hematopoiese pós-alotCE foi feita com sistema *Mentype Chimera* (Biotype Diagnostic GmbH, Dresden, Germany), de acordo com as instruções fornecidas. Este sistema é baseado num painel de marcadores genéticos do tipo repetições curtas em tandem (STRs, short tandem repeats), com análise por PCR e eletroforese capilar (PCR-STR/CE). Em breve, foram preparadas reações de PCR contendo 1 a 1.5 ng de DNA dos doentes pré-transplante e dos dadores e das frações celulares separadas por 'FACS Cell-Sorting'. Estas reações foram constituídas com os seguintes componentes do kit: 2.5  $\mu$ l da mistura primers fluorescentes, 5  $\mu$ l de mistura reacional A e 1 UI de Multi Taq2 DNA polimerase (Biotype Diagnostic GmbH) num volume final de 25  $\mu$ l. O perfil térmico da PCR foi 94°C 4 min., 30 ciclos 94°C 30 seg., 60°C 2 min., 72 Ct 1.5 min. seguido de uma extensão a 68°C por 60 min. num termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems).

Os produtos de PCR obtidos foram diluídos 1:5 em H<sub>2</sub>O MilliQ e foi preparada a mistura para injeção em CE. Preparou-se um 1  $\mu$ l do produto diluído, 12  $\mu$ l de formamida (Applied Biosystems) e 0.5  $\mu$ l do marcador de peso molecular BTO (Biotype Diagnostic GmbH), a mistura foi desnaturada 3 min. a 95°C. A CE foi feita com POP7 (Applied Biosystems), um tempo de injeção de 5 seg. e as condições standard para separação de fragmentos num sistema ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems).

O sistema *Mentype Chimera* faz a análise simultânea dos alelos gonossomais *Amelogenina* X e Y e dos alelos autossómicos dos seguintes loci STR (Short Tandem Repeat): *D2S1360*, *D3S1744*, *D4S2366*, *D5S2500*, *D6S474*, *D7S1517*, *D8S1132*, *D10S2325*, *D12S391*, *D18S51*, *D21S2055* e *SE33*. Os genótipos pré-transplante do recetor e do dador foram estabelecidos de forma a definir a constelação de alelos e de marcadores informativos para a definição da origem das células no pós-transplante. O cálculo da razão dos genótipos dador/recetor no pós-transplante, para cada população celular, foi feita com a análise dos vários eletroferogramas com o software *GenoProof3 v3.0.4* (Qualitytype GmbH, Dresden, Alemanha). Todas as análises foram validadas,

separando em simultâneo um *'allelic ladder'* que serviu de calibrador às condições de migração da CE.

### 3.12. Análise da Diversidade KIR na População Portuguesa.

Foram selecionados 229 indivíduos não-relacionados com residência no território nacional e os nomes próprios e familiares de origem portuguesa nos grupos de doentes com transplante autólogo, controlos, doentes com transplante alogénico e dadores não relacionado. Estes indivíduos foram genotipados em relação à presença ou ausência dos vários loci KIR com o sistema KIR SSO Genotyping Test (One Lambda) tal como descrito anteriormente. A frequência de portadores ( $F$ ) dos genes KIR foi obtida por contagem direta dos genótipos. A frequência genética ( $f_G$ ) foi estimada com um algoritmo *'expectation-maximization'* (EM) implementado nas ferramentas de análise genética Gene[rate] [324, 325] que verificam ainda o equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) na população. Os  $F$ 's KIR das populações vizinhas espanhola e marroquina e outras europeias foram obtidos da base de dados [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net) (AFN) [326] e as  $f_G$  de cada loci foi estimada usando a fórmula de Bernstein:  $f_G = 1 - \sqrt{1 - F}$  [327].

Os haplótipos KIR A/B e a organização centromérica e telomérica do *cluster* de genes KIR foram inferidos a partir do conteúdo do genótipo KIR de cada indivíduo, de acordo com os desequilíbrios de ligação genéticos previamente descritos [328]. Em breve, se qualquer dos genes 2DL2, 2DL5, 3DS1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5 estavam presentes, o genótipo foi considerado conter um haplótipo B. Se nenhum desses genes estava presente, o indivíduo foi considerado conter os haplótipos A/A. Não sendo possível distinguir A/B de B/B, por não ser conhecida as fases dos genótipos, estes indivíduos foram classificados como Bx. Já os genótipos das partes centroméricas (Cen) e teloméricas (Tel) foram designados de acordo com o seguinte conteúdo genético:

- CenA/A contém unicamente o 2DL3
- Cen A/B contém 2DL3 com 2DS2 e/ou 2DL3
- Cen B/B contém 2DS2 e/ou 2DL2, mas não o 2DL3
- Tel A/A contém unicamente 3DL1 e 2DS4
- Tel A/B contém 3DL1 e 2DS4 com 3DS1 e/ou 2DS1
- Tel B/B não contém 3DL1 e/ou 2DS4

As frequências dos haplótipos KIR na extensão completa Tel-Cen foi estimada com o algoritmo EM e foi avaliado o desequilíbrio de ligação entre estas frações do cluster KIR.

A população portuguesa foi comparada com os resultados obtidos para outras populações disponíveis em <http://www.allelefrequencies.net/> [326].

### **3.13. Análise da Alocação de Genes KIR e da Distribuição de Interações entre Recetores KIR do Dador e Ligandos HLA do Doente no Transplante Alogénico.**

Para este estudo genético foram estabelecidos 3 grupos de doentes com um transplante alogénico. O primeiro grupo constou de 111 pares dador-recetor aparentados HLA geno-idênticos, o segundo grupo inclui 101 transplantes com dadores não relacionados HLA compatíveis identificados no registo nacional de dadores voluntários de medula óssea - CEDACE e no terceiro grupo foram incluídos 102 transplantes com um dador compatível, também de painel, mas identificado em registos internacionais através do motor de busca do Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW). A totalidade dos dadores dos 3 grupos assim como 42 doentes com transplante relacionado e 43 doentes com dador não relacionado foram genotipados em reação ao conteúdo de genes KIR. A organização genómica KIR e a frequência de motivos centroméricos e teloméricos A e B foi inferida tal como referido no ponto anterior.

Por outro lado, foi estabelecida a distribuição de ligandos HLA classe I nos recetores. Os genótipos HLA-C dos doentes foram classificados em relação ao dimorfismo na posição 80 como homozigóticos C1 (especificidade HLA C com Asparagina 80) ou C2 (com Lisina 80) (tal como definido na tabela 1) ou então como heterozigóticos C1/C2. O primeiro alotipo C1 constitui o ligando dos KIR2DL2 e DL3, e o segundo alotipo C2 o ligando dos KIR2DL1 e 2DS1. Foram identificados os alotipos HLA A e B com o motivo Bw4 que constitui o ligando do KIR3DL1 e possivelmente também do 3DS1 (tem sido proposto que a interação KIR3DS1-Bw4 é modelada pelo péptido antigénico carregado pela molécula HLA [329]). Os grupos Bw4 positivos foram classificados de acordo com o descrito [330] em relação ao dimorfismo da posição 80 que apresenta uma Isoleucina (Bw4I80) ou uma Treonina (Bw4T80). A forma Bw4I80 apresenta uma interação com maior afinidade com o KIR3DL1 e possivelmente com 3DS1 [329].

Foram finalmente avaliadas as interações KIR do dador e os ligandos do doente resultantes do transplante potencialmente promotoras de uma reação alogénica mediada por células NK no sentido do enxerto contra o hospedeiro. Em cada grupo de doentes foi estabelecida a distribuição de KIR inibitórios alocados com ligandos HLA classe I ausentes no recetor. Da mesma forma, foram identificadas as interações dos KIR de ativação alocados transplante a presença dos respetivos ligandos no recetor.

### 3.14. Análise Estatística

Os resultados do estudo foram organizados em folhas de cálculo e a análise estatística foi efetuada com o programa GraphPad Prism 6.f (GraphPad Software, La Jolla, CA). Foram utilizados métodos estatísticos descritivos para a análise das distribuições de variáveis quantitativas contínuas. A distribuição destes valores foi verificada não normal, pelo teste D'Agostino-Pearson, sendo expressa como o valor mediano e a variação como a amplitude interquartis (IQR, 25%-75%). A distribuição ordenada de valores obtida para a população controlo, foi usada para estabelecer os intervalos de referência normais de um determinado parâmetro quantitativo, que são expressos como a amplitude entre o décimo percentil (P10%) e o percentil 90 (P90%) (AIP10%-P90%). As comparações de variáveis quantitativas contínuas entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Man-Whitney U. A interdependência entre variáveis foi testada com o teste de correlação de Spearman. Os doentes foram agrupados de acordo com variáveis clínicas pré e pós-transplante, organizados em tabelas de contingência, de forma a avaliar o impacto dessas variáveis na recuperação de populações celulares, com um '*cut-off*' definido como o P10% da mesma população celular na população controlo de referência. Os grupos de variáveis categóricas foram comparados pelo teste exato de Fisher e a sua associação expressa como o '*odds ratio*' com o intervalo de confiança em nível de 95% (OR, 95%CI). Os testes efetuados foram bilaterais e considerados significativos se  $P < 0.05$ .

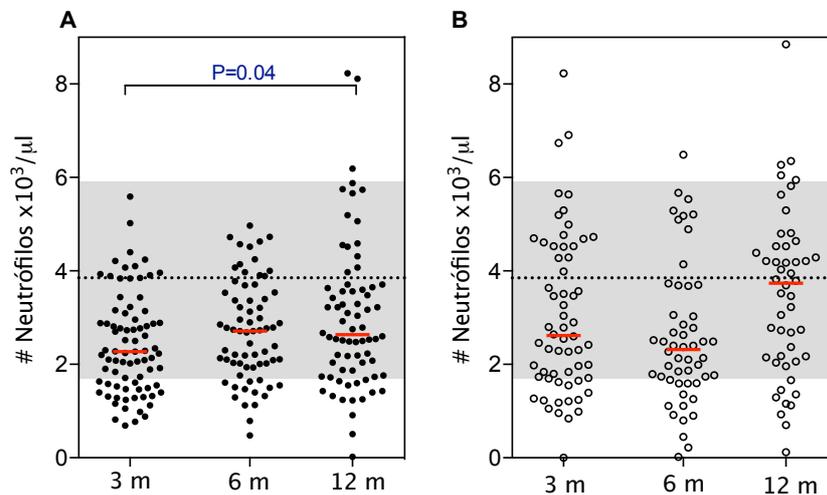


## 4. Resultados

### 4.1. Evolução das Populações Celulares Imunocompetentes derivadas da Mielopoiese no Pós-Transplante

#### 4.1.1. Análise da Neutropoiese Após o Período de Enxerto

A recuperação da granulopoiese e em particular dos neutrófilos é um indicador principal da função do enxerto e da regeneração hematopoiética. Foi feita uma análise dinâmica das contagens absolutas de neutrófilos nos doentes submetidos a transplante autólogo e alogénico no final do período do pós-enxerto aos 3 meses, aos 6 meses e 12 meses de evolução (figura 15).



**Figura 14 – Evolução das contagens absolutas de neutrófilos no sangue periférico dos doentes submetidos a transplante.**

(A) representação da distribuição das contagens de neutrófilos aos 3, 6 e 12 meses após o transplante autólogo. (B) distribuição da contagem de neutrófilos no sangue periférico aos 3, 6 e 12 meses após o transplante alogénico. São representadas as distribuições das contagens de células e a mediana da distribuição a cada tempo de análise (linha vermelha). O intervalo normal da distribuição destas células foi estabelecido a partir da população de controle e a sua amplitude está representada como a área sombreada definida pelo P10 ( $1.7 \times 10^3$  cél./ $\mu\text{l}$ ) ao P90 ( $5.9 \times 10^3$  cél./ $\mu\text{l}$ ) e a mediana pela linha tracejada ( $3.8 \times 10^3$  cél./ $\mu\text{l}$ ). A comparação da evolução das contagens celulares entre os tempos de análise foi estabelecida com o teste de Mann-Whitney e são mostradas as diferenças significativas.

A população de doentes com transplante autólogo apresentou desde os três meses de evolução uma contagem média de neutrófilos no intervalo normal (figura 14A). Ainda assim, no primeiro tempo de análise, foram detetados 4 (5%) doentes com neutropenia moderada ( $500 \leq \text{ANC} < 1000$ ) e 14 (17.3%) com neutropenia ligeira ( $1000 \leq \text{ANC} < 1500$ ). Aos 6 meses de evolução 1 (1.5%) doente apresentou uma

neutropenia grave ( $ANC < 500$ ) e um segundo uma neutropenia moderada, nenhum dos dois sobreviveu até ao ponto de análise seguinte. Com neutropenia fraca, apresentaram-se nesta altura 6 (8.7%) doentes. Com um ano de evolução, 2 (2.7%) doentes apresentaram uma neutropenia grave, 1 (1.4%) a forma moderada e 7 (9.6%) a forma fraca desta deficiência celular.

Em relação ao alotransplante, a contagem de neutrófilos da população de doentes apresentou valores médios no intervalo normal e sem variações significativas durante o período da análise (figura 14B). Aos 3 meses de evolução, 82% dos doentes apresentaram contagens de neutrófilos dentro dos intervalos normais sendo a contagem média destas células e um só doente (1.6%) apresentou uma neutropenia grave, não tendo sobrevivido até ao ponto seguinte de análise. Com neutropenia moderada foram encontrados 3 (4.9%) doentes e 7 (11.5%) com neutropenia ligeira. A avaliação aos seis meses indicou 10 (19.2%) doentes neutropénicos, 3 (5.7%) com uma baixa celular grave (destes, 2 sobreviveram até à avaliação dos 12 meses), 3 outros moderada e 4 com neutropenia ligeira.

Aos 12 meses a contagem média de neutrófilos nos doentes sobreviventes é muito próxima da população controlo (3.7 (2.1-4.6) versus 3.8 (1.7-5.9), respetivamente) (figura 15B) e são detetados 7 doentes neutropénicos, 1 (2%) grave, 2 (4%) moderada e 3 (9.8%) ligeira).

#### **4.1.1.1. Fatores Relacionados com a Consolidação da Neutropoiese**

Nos doentes com transplante autólogo observou-se uma incidência de infeções virais menor no grupo que aos 3 meses de evolução apresentou uma recuperação neutrófilos para o intervalo normal (75% dos doentes livres de infeções com contagem de neutrófilos normal versus 53.9% dos doentes sem infeções com contagens de neutrófilos inferior ao normal;  $OR=0.3$ , 95% CI, 0.08-0.96,  $P<0.05$ ) (tabela 13). Outros fatores demográficos ou clínicos não surgiram, nesta série de doentes, relacionados com a capacidade da recuperação normal da neutropoiese durante a primeira fase do pós-transplante de longo prazo.

As características do enxerto surgiram como um fator principal, condicionante da capacidade de recuperação da neutropoiese nos aloTCEs. Verificou-se que uma proporção superior dos doentes que fizeram enxertos com PBSCs apresentou contagens celulares no intervalo normal por comparação com os doentes que fizeram transplantes com MO. Este fator, é significativo na primeira fase da evolução do transplante e em conjunto com a idade é ainda fator condicionante de uma recuperação normal aos 12 meses de evolução (tabela 12). O conteúdo celular do

enxerto revelou também ser relevante recuperação da neutropenia pós-transplante em particular no ponto médio da análise onde as contagens de células CD34<sup>+</sup> surgem relacionadas com uma recuperação normal de neutrófilos (tabela 12).

**Tabela 12 – Análise da recuperação dos neutrófilos nos doentes submetidos a transplante de CEHs**

	N/NT (%)	OR (95%CI)	P	N/NT (%)	OR (95%CI)	P	N/NT (%)	OR (95%CI)	P
	3 meses			6 meses			12 meses		
<b>Tx autólogo</b>									
<b>Infeções</b>									
Vírus +	6/13 (46.1)	0.3	0.049	5/7 (71.4)		ns	6/9 (71.4)		ns
Vírus -	51/68 (75)	0.08-0.96		50/62 (80.6)			51/62 (82.3)		
<b>Tx Alogénico</b>									
<b>Idade ao Tx</b>									
≤18	11/22 (50)		ns	13/19 (68.4)		ns	9/17 (52.9)	0.21	0.04
>18	28/3 (71.7)			25/33 (75.8)			27/32 (84.4)	0.05-0.8	
<b>Enxerto</b>									
MO	8/10 (40)	0.24	0.01	8/17 (47)	0.15	0.006	7/14 (50)	0.2	0.03
PBSC	31/42 (73.8)	0.07-0.7		30/35 (86)	0.03-0.6		29/35 (83)	0.05-0.8	
<b>Doença Primária</b>									
Doença Maligna	31/40 (77.5)	5.6	0.004	28/35 (80)		ns	27/33 (81.8)		ns
Outras**	8/21 (38.1)	1.8-17.7		10/17 (58.8)			9/16 (56.2)		

N, número de doentes do grupo com contagem de neutrófilos  $\geq 1.7 \times 10^3$  cél./ $\mu$ l (P10 do controlo); NT, número total de doentes do grupo; OR, odds ratio; 95% CI, intervalo de confiança de 95%. MO, medula óssea; PBSC, células estaminais periféricas mobilizadas.

\*São comparados os doentes que levaram um enxerto com uma contagem de células CD34<sup>+</sup> inferior ao percentil 25% (P25% da distribuição total da quantidade de células de todos os enxertos,  $2.6 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/Kg), com os doentes que levaram um enxerto com uma contagem de CD34<sup>+</sup> superior ao P75% ( $7.0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/Kg).

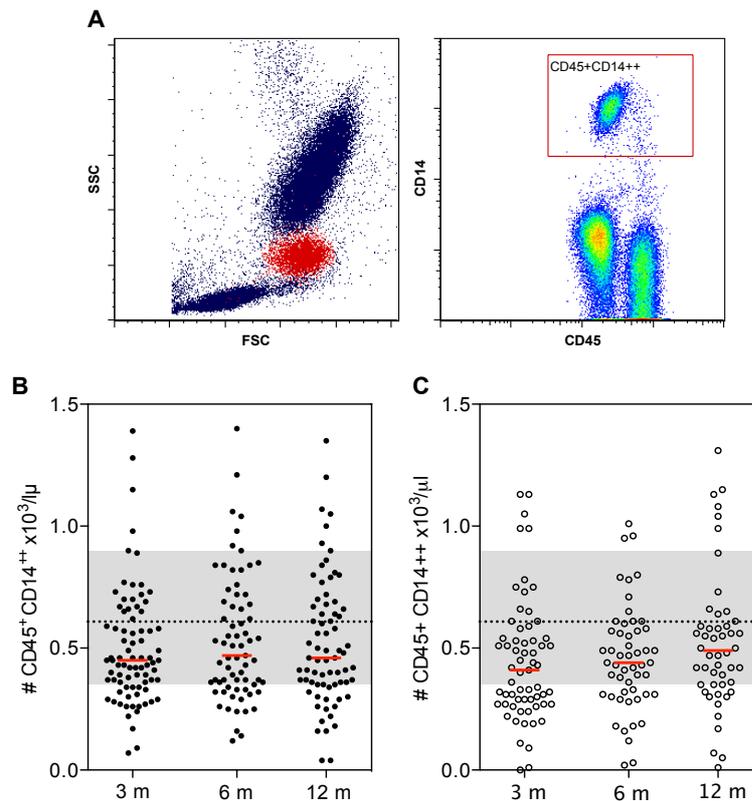
\*\* 9 doentes com deficiências genéticas + 12 doentes com síndromes aplásicos/mielodisplasias.

Outro fator que parece condicionar esta recuperação hematológica nos transplantes alogénicos é a natureza da doença primária e a sua evolução, na medida em que a recuperação aos 3 meses é mais difícil no grupo de doentes que reúne as anemias e aplasias medulares.

#### 4.1.2. A Dinâmica da Recuperação da Monopoiese

A análise da recuperação da monopoiese foi realizada quantificando por citometria de fluxo a população principal de monócitos com o fenótipo CD45<sup>+</sup>CD14<sup>++</sup> (figura 15A). Ambas as populações de doentes submetidos a transplante autólogo e alogénico apresentaram uma contagem média de monócitos no intervalo normal sem alterações

significativas entre os pontos da análise (figura 15B e C).



**Figura 15 – Caracterização e quantificação da população de monócitos no pós-transplante de células hematopoiéticas**

(A) caracterização fenotípica por citometria de fluxo dos monócitos circulantes no sangue periférico como células  $CD45^+CD14^{++}$ . (B) distribuição das contagens de monócitos aos 3, 6 e 12 meses após o transplante autólogo. (C) contagens de monócitos aos tempos de análise após o transplante alogénico. As representações gráficas evidenciam as distribuições e a mediana (barra vermelha) das contagens celulares. A área sombreada indica a amplitude da distribuição normal destas células estabelecida pelos limites do P10 (350  $cél/\mu l$ ) e o P90 (896  $cél/\mu l$ ) na população controlo (mediana, 570  $cél/\mu l$ ).

Nos vários pontos da análise foram observados entre 20 a 23% de doentes com enxerto autólogo com contagens de monócitos inferiores a 300  $cél/\mu l$  (aos 3 meses: 18 doentes, aos 6 meses: 16 doentes e aos 12 meses: 15 doentes). No entanto, a análise dos fatores clínicos pré-transplante, das características dos enxertos e da evolução clínica pós-transplante não revelou associações significativas com a capacidade de recuperação das contagens de monócitos.

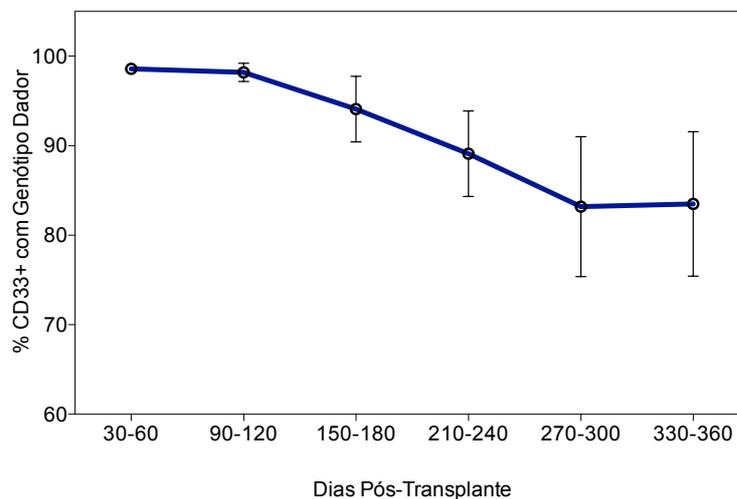
Já a população com transplante alogénico revelou uma evolução positiva na recuperação de uma monopoiese normal. Aos 3 meses 28 (44%) doentes apresentaram contagens celulares inferiores a 300  $cél/\mu l$  e aos 6 e 12 meses o número destes doentes diminuiu para 16 (30,7%) e 11 (22%) respetivamente.

De todos os fatores analisados nesta população, a normalização da monopoiese só

apresentou uma correlação pouco definida com os extremos da dosagem de células CD3<sup>+</sup> no enxerto na análise aos 6 meses. Os doentes com um enxerto, em que a dosagem de células CD3<sup>+</sup> era inferior ao percentil 25 da distribuição do conteúdo destas células em todos os enxertos, apresentaram uma maior capacidade de recuperar as contagens periféricas de monócitos para o intervalo normal, quando comparados com os doentes com enxertos com um conteúdo de células CD3<sup>+</sup> no P75% (83,3% versus 33,3%, respetivamente; OR:10, CI95%:1.4-69.3; P=0.046)

#### 4.1.3. Análise da Evolução do Quimerismo Celular da Linhagem Mieloide no Pós-alotCE.

Na série de doentes com aloenxerto referenciada neste estudo, a frequência de células com genótipo do dador na fração celular CD33<sup>+</sup> isolada no sangue periférico, foi de 98.0% ( $\pm 3.0$ ) (média $\pm$ SEM) nos três primeiros meses de evolução (figura 16).



**Figura 16 – Evolução do quimerismo celular do compartimento mielóide CD33<sup>+</sup>.**

As células CD33<sup>+</sup> foram separadas por *FACS cell-sorting* e foi quantificada a frequência relativa de células com o genótipo de dador relativamente ao genótipo autólogo. A curva representa a evolução da frequência de células do dador que fizeram o desenvolvimento mielóide no sangue periférico da população de doentes em seis intervalos de tempo durante o primeiro ano de evolução. Os pontos representam a média $\pm$ SEM.

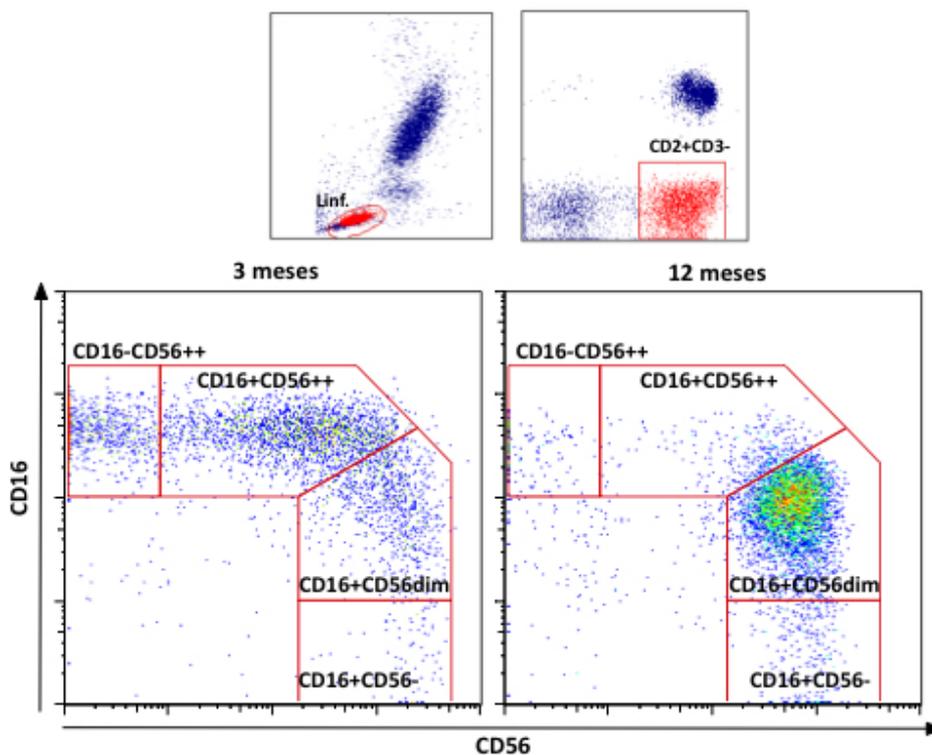
A partir do segundo semestre de evolução foi observada uma descida da frequência média de células CD33<sup>+</sup> do dador primeiro para 94.5% ( $\pm 17.8$ ) e aos 12 meses de evolução para 83.2% ( $\pm 34.2$ ). Esta descida deveu-se muito provavelmente, ao desenvolvimento de recidiva de doença leucémica da linhagem mielóide por alguns doentes. Com um ano de evolução, 7 doentes apresentaram recidiva refratária de leucemias mielóides e 1 doente fez um quimerismo hematopoiético dividido, em que as células derivadas do desenvolvimento mielóide são totalmente autólogas (0% quimerismo) e as células linfóides (células T e NK) são maioritariamente derivadas do

dador (>90%).

## 4.2. Análise da Recuperação da Linfopoiese e Reconstituição dos Repertórios Estruturais e Funcionais de células NK, B e T

### 4.2.1. A Recuperação da Linfopoiese NK

O compartimento periférico de células linfoides NK, dos doentes transplantados e da população controlo foi avaliado por citometria de fluxo, para a definição de 4 subpopulações celulares com base na expressão diferencial do CD16 e do CD56 [90-93]. A primeira população celular, com uma maturidade mais precoce, foi definida como os linfócitos NK  $CD2^+CD3^-CD56^{++}CD16^-$ ; a segunda com uma maturidade intermédia, com o fenótipo  $CD2^+CD3^-CD56^{++}CD16^+$ ; a terceira como as células NK maduras com o fenótipo  $CD2^+CD3^-CD56^{dim}CD16^+$ ; e a quarta como uma população de células NK com diferenciação terminal com o fenótipo  $CD2^+CD3^-CD56^-CD16^+$  (figura 17).



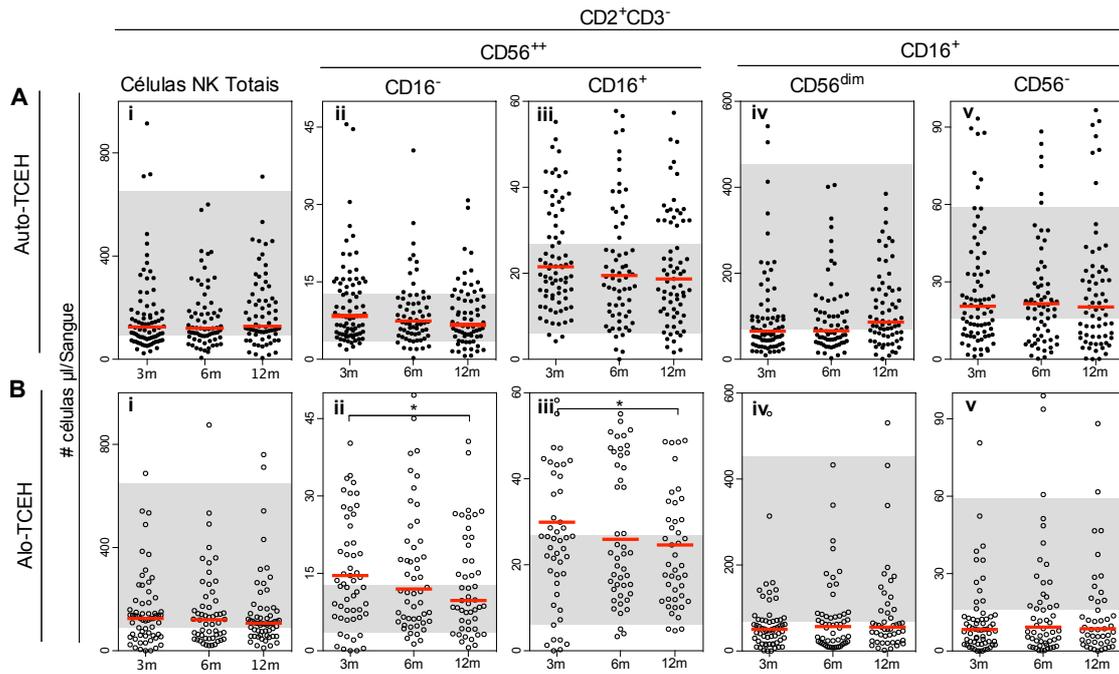
**Figura 17 – Caracterização e quantificação por citometria de fluxo das subpopulações de células NK.**

Os linfócitos  $CD2^+CD3^-$  que correspondem ao compartimento total de células NK foram classificados pela expressão diferencial do CD56 e do CD16 nas populações principais de células NK do sangue periférico: as populações imaturas  $CD56^{++}CD16^-$  e  $CD56^{++}CD16^+$  e as populações maduras  $CD56^{dim}CD16^+$  e terminalmente diferenciada  $CD56^{dim}CD16^+$ . Na figura é ilustrado um exemplo da evolução da composição do compartimento de células NK na primeira fase da avaliação (3 meses) e aos 12 meses.

#### 4.2.1.1. Recuperação das Células NK nos Doentes Submetidos a Transplante

Os doentes com transplante alogénico e autólogo apresentaram uma recuperação quantitativa das células NK totais relativamente idêntica. Na avaliação aos 3 meses e até aos 12 meses após o transplante, a mediana das contagens absolutas das células NK totais apresentou-se pouco acima do limite inferior do intervalo normal, nos dois grupos de doentes (125.4 (58.7-195.5), 107.2 (67.5-163.7) e 120.2 (78.5-202.8), 127.9 (97.1-244.0) células NK/ $\mu$ l sangue; alo e autoTCE aos 3 e 12 meses após o transplante, respetivamente, *versus* intervalo normal 91.5-649.5) (Figuras 18Ai and 18Bi). Contudo, foram observada algumas diferenças na composição dos compartimentos celulares NK dos grupos dois grupos de transplantados. Aos 3 meses de evolução, os doentes em recuperação de um transplante alogénico apresentaram uma expansão muito evidente das populações de células NK mais imaturas CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> e das células intermediárias CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> (14.6 (7.8-30.5) e 29.9 (20.6-73.6) células/ $\mu$ l sangue *versus* intervalos normais, 3.6-12.7 e 6.0-26.9), respetivamente, (figuras 18Bii e iii). Nas análises subsequentes a dimensão destas populações celulares imatura apresentou uma tendência de redução para a normalidade, mas aos 12 meses, o compartimento celular NK continuou alterado por comparação com os controlos.

Nos transplantes autólogos, as contagens das populações de células CD56<sup>++</sup> apresentaram-se no intervalo normal e sem variações significantes durante a análise, (8.4 (4.8-14.8), 7.4 (4.9-11.9) e 6.7 (4.5-12.0) células CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> células/ $\mu$ l aos 3, 6 e 12 meses respetivamente) e (21.5 (14.7-35.6), 19.5 (11.1-34.0) e 18.7 (11.0-32.3) células CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> / $\mu$ l aos 3, 6 e 12 meses respetivamente) (figuras 18Aii e iii).



**Figura 18 – Análise da reconstituição das subpopulações de células NK após o transplante autólogo e alogénico de células estaminais hematopoiéticas.**

A) Contagens de células NK no sangue periférico (i), das subpopulações de células NK com alta densidade de CD56 mais imaturas ( $CD56^{++}CD16^{-}$ ) (i) e intermédias ( $CD56^{++}CD16^{+}$ ) (ii), das células NK maduras  $CD56^{dim}CD16^{+}$  (iv) e da população celular terminalmente diferenciada  $CD56^{-}CD16^{+}$  nos doentes em recuperação de autoTCE aos tempos de análise 3, 6 e 12 meses após os transplantes. B) Contagens das mesmas populações celulares nos doentes com alotransplante aos tempos de análise. As representações gráficas evidenciam as distribuições e a mediana (barra vermelha) das contagens de células. A área sombreada indica a amplitude do intervalo normal das células estabelecido como o P10 ao P90 da distribuição destas células na população controlo. A comparação da evolução das contagens das subpopulações celulares, entre os tempos de análise foi estabelecida com o teste de Mann-Whitney e são mostradas as diferenças significativas. \* $P < 0.05$ .

Quanto às células  $CD56^{dim}CD16^{+}$ , ambos os grupos de doentes apresentaram uma depleção inicial significativa desta população de células NK maduras. O grupo com transplante alogénico apresentou um aumento desta população celular muito lenta e gradual; e aos 12 meses de evolução, estes doentes ainda apresentaram contagens celulares inferiores ao limite mínimo normal (60.8 (34-123) células/ $\mu$ l *versus* intervalo normal 68.4-452.7) (figura 18Biv). O grupo de doentes com transplante autólogo apresentou uma recuperação destas células mais eficiente e desde os seis meses de evolução as medianas das contagens de células apresentaram valores no intervalo normal (86.5 (54.3-163.2) cells/ $\mu$ l) (figura 18Aiv).

Finalmente, da análise da população de células terminalmente diferenciadas  $CD16^{+}CD56^{-}$  pode ser observado os recetores de enxertos autólogos apresentam níveis normais, desta população de células, desde os 3 meses de evolução (figura 18Av). Nos doentes com transplante alogénico esta população celular apresentou

contagens inferiores aos limites normais durante todo o período de análise (figura 18Bv).

A capacidade de recuperação da população madura de células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> aos 12 meses foi avaliada, nos dois grupos de doentes, em relação dos vários fatores clínicos pré e pós-transplante. A idade do doente ao transplante, a doença primária e o seu estadió antes do transplante, assim como a incidência de infeções após o transplante, não parecem ser fatores, que nestas séries de doentes, tenham impacto a capacidade de recuperação das contagens de células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> para o intervalo normal após um ano de evolução. Foi ainda avaliada a dosagem de células CD34<sup>+</sup> no enxerto não tendo sido obtida qualquer correlação significativa. Foram analisados os níveis das células CD56<sup>++</sup> nos pontos anteriores de análise como putativas precursoras em relação às células NK terminalmente diferenciadas CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e não se observaram correlações significativas.

#### **4.2.1.2. Relação entre os níveis de células T e a composição celular do compartimento periférico de células NK no pós-transplante**

Para esta análise, os recetores de ambos os grupos com transplante autólogo e alogénico foram divididos em grupos de acordo com os seus níveis individuais de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes, a cada um dos tempos da análise. O primeiro grupo incluiu os doentes com contagens de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> inferiores ao primeiro quartil (<25% P) da distribuição total de todos os doentes. O segundo grupo incluiu os doentes com níveis de células T acima do valor da mediana (>50% P) da distribuição de todos os doentes. Estes grupos de doentes, com níveis de células T superiores e inferiores, apresentaram diferenças significativas em relação às proporções relativas das subpopulações de células NK, que estão sumarizadas na tabela 14.

Aos 3 meses de evolução, verificou-se que em ambos os tipos de transplante, os grupos de doentes com níveis baixos de células T CD4<sup>+</sup> apresentaram frequências mais elevadas de células NK imaturas CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> e CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0.044$ ,  $p<0.0001$  e  $p=0.023$ ,  $p=0.032$  para a população de doentes com auto e alotransplante, respetivamente). Consequentemente, os doentes com contagens superiores de células T CD4<sup>+</sup> apresentaram uma proporção maior de células maduras CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0.049$  e  $p=0.001$  no grupo com auto e alotransplante, respetivamente). Uma correlação semelhante foi observada para a população de células NK terminalmente diferenciada de células NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> somente nos doentes com transplante autólogo ( $p=0.0005$ ) (tabela 14).

**Tabela 14. Relação entre os níveis de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a frequência das subpopulações celulares do compartimento periférico de células NK nos doentes transplantados.**

		Células NK								
Auto-HSCT	n	CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>++</sup>		CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>++</sup>		CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>dim</sup>		CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup>		
		% (IQR)	p	% (IQR)	p	% (IQR)	p	% (IQR)	p	
<b>Células T, 3 meses</b>										
CD4 <sup>+</sup>	<P25	20	7.4 (4.8-14.1)	0.044	24.3 (18.6-29.1)	<0.0001	48.4 (40.4-	0.049	10.8 (6.0-14.2)	0.0005
	>P50	41	5.4 (4.0-8.3)		13.2 (9.4-19.2)		56.8 (48.2-		15.5 (13.0-	
CD8 <sup>+</sup>	<P25	21	7.2 (3.9-10.0)	ns	20.5 (15.2-27.5)	0.01	50.9 (41.0-	ns	13.4 (7.7-17.4)	ns
	>P50	40	5.3 (4.0-7.9)		13.3 (9.9-18.6)		56.5 (48.9-		16.5 (12.6-	
<b>Células T, 6 meses</b>										
CD4 <sup>+</sup>	<P25	17	7.3 (4.4-12.6)	ns	20.3 (15.5-	0.014	45.7 (32.2-	0.001	13.2 (6.8-23.2)	ns
	>P50	35	6.3 (3.5-8.8)		12.2(7.6-18.9)		56.6(45.4-64.5)		19.3 (10.1-	
CD8 <sup>+</sup>	<P25	17	5.5 (4.4-10.1)	ns	16.4 (8.1-23.2)	ns	53.5 (35.2-	ns	19.0 (7.4-26.0)	ns
	>P50	34	6.4 (4.0-8.2)		12.8 (8.7-19.9)		54.2 (45.1-		18.8 (10.6-	
<b>Allo-HSCT</b>										
<b>Células T, 3 meses</b>										
CD4 <sup>+</sup>	<P25	17	20.9 (10.9-	0.023	33.7 (26.1-45.0)	0.032	34.5 (20.3-	0.018	6.2 (3.2-10.8)	ns
	>P50	32	12.3 (6.5-17.1)		26.3 (18.9-36.5)		41.3 (31.2-		6.7 (3.0-10.19)	
CD8 <sup>+</sup>	<P25	16	18.8 (11.8-	0.026	37.6 (27.5-43.2)	0.0036	34.6 (25.1-	0.027	6.3 (3.9-10.2)	ns
	>P50	33	10.4 (6.5-17.4)		25.5 (19.3-32.2)		43.7 (31.2-		7.5 (4.2-11.6)	
<b>Células T, 6 meses</b>										
CD4 <sup>+</sup>	<P25	13	10.2 (6.2-18.8)	ns	28.3 (12.3-40.0)	ns	47.7 (34.5-	ns	9.0 (1.7-20.0)	ns
	>P50	26	10.2 (6.1-14.8)		25.6 (16.4-31.8)		44.8 (34.9-		12.6 (4.5-15.2)	
CD8 <sup>+</sup>	<P25	13	10.4 (5.2-16.2)	ns	33.7 (17.0-41.0)	ns	45.8 (33.9-	ns	6.7 (1.7-15.2)	ns
	>P50	27	10.3 (7.3-20.8)		22.7 (13.1-35.2)		42.2 (35.3-		11.8 (4.7-17.3)	

<P25, grupo de doentes com contagens de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> T inferiores ao primeiro quartil da distribuição de todos os doentes no tempo de análise; >P50, grupo de doentes com contagens de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> T superiores à mediana da distribuição de todos os doentes; n, número de doentes em cada grupo. Os valores representam a mediana e o intervalo interquartil (IQR) das frequências de cada subpopulação de células NK; p, comparação das frequências de cada subpopulação de células NK entre cada grupo de doentes com níveis diferentes de células; ns, não significante

No mesmo ponto de análise, aos 3 meses, os doentes com transplante alogénico e com baixos níveis de células T CD8<sup>+</sup>, apresentaram igualmente, frequências mais elevadas de células NK CD56<sup>++</sup> mais imaturas e com maturidade intermédia ( $p=0.026$  e  $p=0.0036$ , respetivamente). Da mesma forma, foi observada uma frequência superior de células NK maduras CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, no grupo de doentes com aloenxerto que apresentou os níveis de células T CD8<sup>+</sup> mais elevado. Nos doentes com transplante autólogo foi somente os níveis baixos células T CD8<sup>+</sup> apresentaram uma correlação significativa com uma frequência maior de células NK no estadio intermediário CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0.01$ ); e não foram encontradas correlações dos níveis destas células T com a proporção de células maduras NK (tabela 14).

Aos 6 meses de evolução, foram observadas variações significativas das frequências de células CD16<sup>+</sup>CD56<sup>++</sup> e CD56<sup>dim</sup> relacionadas com os níveis de célula T CD4<sup>+</sup> somente nos doentes com alotransplante ( $p=0.014$  e  $p=0.001$ , respetivamente). Neste ponto da análise, as células T CD8<sup>+</sup> não apresentaram qualquer impacto na constituição do compartimento de células NK. verificou-se ainda que após um ano de evolução dos transplantes, os níveis de células T não são correlacionáveis com a composição do compartimento de células NK (resultados não mostrados).

#### 4.2.1.3. Diversidade dos Repertórios dos Receptores KIR

##### 4.2.1.3.1. Caracterização Genotípica do ‘Cluster’ de Genes KIR Numa População de Origem Portuguesa

Os resultados dos genótipos KIR dos doentes, dos dadores não relacionados e dos controlos, com origem Portuguesa, foram organizados para estabelecer as frequências fenotípicas ( $F$ ) de cada gene KIR e estimar a respetiva frequência genotípica ( $f_G$ ) (tabela 15).

**Tabela 15 – Frequência fenotípica ( $F$ ) e genotípica ( $f_G$ ) dos recetores KIR na população Portuguesa e comparação com duas populações geograficamente próximas, a Espanhola e a Marroquina.**

	Frequências Genes KIR								
	Portuguesa (N=229)		Espanhola (N=131)*			Marroquina (N=67)**			
	$F$ (%)	$f_G$	$F$ (%)	$f_G$	$p$	$F$ (%)	$f_G$	$p$	
<b>Genes Estrutura (Pseudogenes e Inibitórios)</b>									
<i>2DP1</i>	95.3	0.79	93.1	0.74	ns	100.0	1.00	ns	
<i>3DP1</i>	100.0	1.00	100.0	1.000	ns	100.0	1.00	ns	
<i>3DL3</i>	100.0	1.00	100.0	1.000	ns	97.0	0.83	0.048	
<i>2DL4</i>	100.0	1.00	100.0	1.000	ns	100.0	1.00	ns	
<i>3DL2</i>	100.0	1.00	100.0	1.000	ns	100.0	1.00	ns	
<b>Genes Inibitórios</b>									
<i>2DL1</i>	94.9	0.78	93.1	0.74	ns	95.0	0.78	ns	

<i>2DL3</i>	88.5	0.66	86.5	0.63	ns	73.1	0.48	0.003
<i>2DL2</i>	53.6	0.32	56.5	0.34	ns	70.1	0.45	0.017
<i>2DL5</i>	49.8	0.28	52.0	0.31	ns	67.2	0.43	0.013
<i>3DL1</i>	95.3	0.71	98.5	0.89	ns	100.0	1.00	ns
<b>Genes de Ativação</b>								
<i>2DS1</i>	34.0	0.18	44.3	0.25	ns	25.4	0.14	ns
<i>2DS2</i>	56.2	0.34	56.5	0.34	ns	65.7	0.41	ns
<i>2DS3</i>	28.5	0.16	31.6	0.17	ns	52.2	0.31	0.0004
<i>2DS4</i>	95.3	0.77	98.5	0.89	ns	100.0	1.00	ns
<i>2DS5</i>	29.4	0.16	31.3	0.17	ns	32.8	0.18	ns
<i>3DS1</i>	34.0	0.18	42.0	0.23	ns	25.0	0.13	ns

*F*, frequência fenotípica; *f<sub>G</sub>*, frequência genotípica; *p*, valores obtidos para comparação da frequência dos vários genes e haplótipos KIR na população Portuguesa e na Espanhola e entre a população Portuguesa e a Marroquina, são indicados os valores das diferenças significativas (<0.05); ns, não significativo.

\* Informação sobre a população Espanhola disponível em <http://www.allelefrequencies.net/> a partir de dados submetidos por Vilches C., Madrid, Espanha

\*\* Informação sobre a população Marroquina disponível em <http://www.allelefrequencies.net/> a partir de dados submetidos por Canossi A., Aquila, Itália

Foi avaliado o desvio de Hardy-Weinberg para a distribuição de cada gene KIR e que revelou o equilíbrio genético da população testada ( $p=1.0$ ).

Em relação à diversidade do cluster de genes KIR, o conteúdo genético individual na população portuguesa variou de 8 a 16 genes KIR e foram identificados 36 genótipos KIR diferentes. Os 5 genótipos mais frequentes contabilizaram cerca de 67% de todos os perfis observados e 18 perfis (50% dos perfis genotípicos identificados) foram encontrados num único indivíduo. Tal como descrito, os genes KIR estruturais *3DL2*, *3DL3* e *2DL4* e o pseudogene *3DP1* são ubíquos nos genótipos encontrados na população portuguesa e outros genes como o *2DL1*, *3DL1*, *2DS4* e *2DP1* estão presentes em mais de 90.0% dos indivíduos (tabela 14).

Também na população portuguesa, os genes KIR inibitórios apresentam uma frequência superior à dos genes de ativação. A frequência dos genes inibitórios excede sempre 0.65, exceto para os genes alélicos *2DL2* (0.32) e *2DL5* (0.28). Já a frequência dos genes de ativação nunca excede 0.40, com exceção do *2DS4*, que é um gene estrutural do arranjo telomérico mais comum, o *Tel-A*. Em relação à distribuição e zigosidade dos genes do mesmo locus *2DL2/2DL3* e *3DL1/3DS1*, os genótipos mais frequentes foram os homozigóticos *2DL2-/2DL3+* (46,4%) e *3DL1+/3DS1-* (66.0%). A frequência de indivíduos homozigóticos *2DL2* anda *3DS1* foi somente de 11.5% e 4.6%, respetivamente.

A diversidade dos genes KIR da população portuguesa foi comparada com a de duas populações geograficamente próximas, uma população espanhola da região de Madrid e uma população de Marrocos. A distribuição de genes KIR da população Portuguesa apresentou-se relacionada com da população espanhola, mas não com a

marroquina (tabela 15). A distribuição dos genes alélicos *2DL2/2DL3* nos genótipos KIR com origem marroquina é mais balanceada do que nos genótipos com origem portuguesa (0.45 e 0.48 vs. 0.32 e 0.66, respetivamente). Também as frequências dos genes *2DL5* e *2DS3* são superiores na população marroquina em relação à portuguesa (0.43 vs. 0.28 e 0.31 vs. 0.16, respetivamente). De facto, o ‘cluster’ genético KIR da população portuguesa apresenta-se com características muito similares à população espanhola (tabela 15) e também da alemã (dados não mostrados).

Como descrito [302, 328] e exposto nos materiais e métodos, foi inferido com base no conteúdo de genes KIR de cada genótipo individual a organização haplotípica dos genes KIR e caracterizadas as respetivas frequências na população de indivíduos com origem portuguesa (tabela 16).

**Tabela 16 – Diversidade da organização genética do ‘cluster’ de genes KIR na população portuguesa**

Organização Haplotípica	F (%)
<b>Motivos genéticos centroméricos/teloméricos</b>	
<i>Cen-A/A</i>	40.4
<i>Cen-A/B</i>	48.1
<i>Cen-B/B</i>	11.5
<i>Tel-A/A</i>	63.8
<i>Tel-A/B</i>	31.5
<i>Tel-B/B</i>	4.7
<b>Haplótipos KIR</b>	
<i>Cen-A~Tel-A (A)</i>	54.3
<i>Cen-B~Tel-A (B)</i>	25.2
<i>Cen-B~Tel-B (B)</i>	10.8
<i>Cen-A~Tel-B (B)</i>	9.7
<b>Genótipos KIR</b>	
<i>A/A</i>	28.5
<i>A/B</i>	41.7
<i>B/B</i>	11.5
<i>B/x</i>	18.30

F, frequência genética; *Cen*, motivo centromérico; *Tel*, motivo telomérico

O arranjo centromérico *Cen-A/B* apresenta a maior frequência relativa (48,1%) na população do estudo, seguido do motivo *Cen-A/A* (40.4%) enquanto o *Cen-B/B* apresentou uma frequência de 11.5%. O principal motivo telomérico encontrado foi o *Tel-A/A* (63.8%), seguido do *Tel-A/B* (31.8%) e o mais raro o motivo *Tel-B/B* que foi detetado em somente 4.7% dos indivíduos avaliados.

Em relação aos haplotipos estendidos KIR, verificou-se que o mais frequente é o A composto pela combinação de motivos *Cen-A~Tel-A* (54.3%) seguido das

combinações que formam o haplotipo B, *Cen-B~Tel-A* (25.2%), *Cen-B~Tel-B* (10.8%) e *Cen-A~Tel-B* (9.7%) (tabela 16). A partir dos conteúdos e arranjos genéticos foram ainda inferidos os genótipos haplotípicos KIR. O genótipo *A/B* apresentou a frequência mais elevada (41,7%) seguida do *A/A* (28.5%) e finalmente do *B/B* (11.5%). Como as fases gaméticas dos genes não são conhecidas, não foi possível classificar integralmente o genótipo de 42 (18.3%) indivíduos que apresentaram a combinação de arranjos *Cen-A/B, Tel-A/B* é que foram por isso classificados como *B/x*, em que x representa o haplotipo A ou B.

#### 4.2.1.3.2. Alocação dos Genes KIR no Transplante Alogénico Relacionado e Não-Relacionado

Foi avaliada a alocação de genes KIR após o aloTCE com dador relacionado e não-relacionado selecionados com compatibilidades nos locus HLA A, B, C, DRB1 e DQB1. Como seria de esperar, uma vez que o conteúdo de genes KIR não é usado na seleção dos pares dador/recetor, os genes KIR alocados são essencialmente definidos pela frequência destes genes na população. Desta forma, os genes de frequência elevada *2DL1, 2DL3, 3DL3* e *2DS4* foram alocados em mais de 90% dos transplantes relacionados e não-relacionados. Nos transplantes com dador relacionado devido ao elevado grau de proximidade genética há uma maior probabilidade de uma alocação de genes de idênticos ao repertório do recetor, em particular para os genes de frequência média como os *2DL2, 2DL5* e *2DS3* (tabela 17).

**Tabela 17 – Alocação dos genes KIR do dador no transplante alogénico com dador relacionado e não-relacionado e distribuição de alotipos HLA do recetor ligando KIR.**

	Tx Relacionado(n=42)		Tx Não-Relacionado (n=43)	
	D+/R+ n (%)	D+/R- n(%)	D+/R+ n(%)	D+/R- n(%)
<b>Genes Inibitórios</b>				
<i>2DL1</i>	<b>42 (100.0)*</b>	0 (0.0)	<b>36 (83.7) *</b>	3 (7.0)
<i>2DL3</i>	35 (83.3)	4 (9.5)	31 (72.1)	5 (11.6)
<i>2DL2</i>	<b>20 (47.6)**</b>	4 (9.5)	<b>8 (18.6) **</b>	11 (25.6)
<i>2DL5</i>	<b>18 (42.9)*</b>	<b>2 (4.8)**</b>	<b>9 (20.9) *</b>	<b>13 (30.2) **</b>
<i>3DL1</i>	40 (95.2)	1 (2.4)	42 (97.7)	1 (2.3)
<b>Genes de Ativação</b>				
<i>2DS1</i>	11 (26.2)	2 (4.8)	8 (18.6)	8 (18.6)
<i>2DS2</i>	<b>19 (45.2)*</b>	6 (14.3)	<b>10 (23.3) *</b>	10 (23.3)
<i>2DS3</i>	<b>12 (28.6)*</b>	<b>1 (2.4)*</b>	<b>4 (9.3) *</b>	<b>9 (20.9) *</b>
<i>2DS4</i>	40 (95.2)	1 (2.4)	42 (97.7)	1 (2.3)

2DS5	6 (14.3)	3 (7.1)	4 (9.3)	8 (18.6)
3DS1	9 (21.4)	<b>3 (7.1) *</b>	6 (14.0)	<b>11 (25.6) *</b>

Tx, transplante, D+/R+, o conteúdo de genes, motivos ou genótipos alocados no transplante é idêntico ao do recetor; D+/R-, o conteúdo de genes, motivos ou genótipos alocados no transplante é distinto do recetor. A negrito estão identificadas diferenças significativas na alocação de genes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

Os genes de frequência mais baixa como os 2DS1, 2DS3, 2DS5 e 3DS1 são de alocação difícil, e em geral, somente 30 a 40% dos recetores recebem estes genes em diferentes combinações.

#### 4.2.1.3.3. Distribuição de Perfis Genotípicos KIR e das Interações com os Ligandos do Recetor no Transplante Alogénico com Dador Relacionado e Dador Não-Relacionado Local ou Internacional.

Os grupos de dadores apresentaram genes e arranjos genéticos KIR com frequências semelhantes à encontrada para a população em geral, exceto em relação ao motivo *Tel-A*, que surgiu relativamente superior nos dadores relacionados comparativamente aos dadores não-relacionados locais e internacionais. Esta diferença apresentou consequências na maior frequência no grupo de dadores relacionados de haplotipos *KIR A/A* e de conteúdos *KIR-B* neutros (Tabela 18). Verifica-se ainda que devido a sua baixa frequência, a alocação dos motivos mais favoráveis *Cen-B/B* e *Tel-B/B*, que compõem o genótipo *B/B*, são os de alocação particularmente difícil. A frequência transplantes com alocação de motivos *Cen-B/B* situou-se entre os 9.9 e os 15.8% e a de motivos *Tel-B/B* foi ainda mais baixa, entre 1.8 e 6.9%. O genótipo *B/B* foi alocado em somente 11.7% dos transplantes relacionados, em 19.8% dos não-relacionados com dador nacional e em 18.6% de dadores internacionais.

Tendo em consideração que um efeito aloreativo antitumoral pelas células NK é potenciado pela ausência nas células do recetor de ligandos do repertório KIR alocado, foi verificada a distribuição nos três grupos de doentes dos principais alotipos HLA reconhecidos como ligandos KIR. Primeiro, verificou-se um equilíbrio na distribuição dos alotipos HLA C1 e C2. Cerca de 78% dos indivíduos de qualquer dos grupos são C1/x, dos quais entre 21 e 32% são homocigóticos C1. Em relação ao alotipo C2, está presente em 68 a 78 % dos doentes e a homocigotia para este alotipo apresenta uma frequência média de 21%. O motivo Bw4 presente em determinados grupos HLA A e numa fração importante dos grupos HLA B apresentou uma distribuição entre 71.6 e os 78.2%. A restante fração de doentes apresentou grupos HLA B contendo somente o motivo Bw6. O Bw4 apresenta um dimorfismo entre uma isoleucina e uma treonina na posição 80, que modela a afinidade dos recetores KIR

específicos para este ligando [331]. A forma de grande afinidade deste alotipo, a Bw4I80, surgiu presente em 55 a 64% dos doentes, enquanto 12.6 a 22.8% apresentou somente forma de baixa afinidade Bw4T80.

**Tabela 18 – Distribuição de perfis genotípicos KIR do dador, dos ligandos HLA classe I do recetor e das interações KIR-Ligando no transplante alogénico com dador relacionado, com dador não-relacionado identificado no registo no painel de dadores nacional e com dadores internacionais**

Transplantes alogénicos de CEH			
	Dador Relacionado N=111	Dador Não-Relacionado Português N=101	Dador Não-Relacionado BMDW N=102
<b>Dador: Genótipos KIR Cen e Tel n (%)</b>			
<i>Cen-A/A</i>	53 (47.7)	40 (39.6)	44 (43.1)
<i>Cen-A/B</i>	47 (42.3)	45 (44.6)	44 (43.1)
<i>Cen-B/B</i>	11 (9.9)	16 (15.8)	14 (13.7)
<i>Tel-A/A</i>	<b>79 (71.2)****/*</b>	<b>44 (43.6)***</b>	<b>59 (57.8)*</b>
<i>Tel-A/B</i>	<b>30 (27.0)**/**</b>	<b>51 (50.5)**</b>	<b>36 (35.3)**</b>
<i>Tel-B/B</i>	2 (1.8)	6 (5.9)	7 (6.9)
<b>Haplotipos KIR completos n (%)</b>			
<i>A/A</i>	<b>41 (40.6) **/*</b>	<b>18 (17.8)**</b>	<b>24(23.5)*</b>
<i>A/B</i>	43 (38.7)	42 (41.6)	45 (44.1)
<i>B/x</i>	14 (12.6)	21 (20.8)	14 (13.7)
<i>B/B</i>	13 (11.7)	20 (19.8)	19 (18.6)
<b>Conteúdo KIR-B (classificação)<sup>#</sup> n (%)</b>			
<i>Neutro</i>	<b>84 (75.7)*</b>	<b>60 (59.4)*</b>	69 (67.9)
<i>Bom</i>	16 (14.4)	25 (24.8)	19 (18.6)
<i>Melhor</i>	11 (9.9)	16 (15.8)	14 (13.7)
<b>Doentes: ligandos HLA classe I (%)</b>			
<i>C1/C1</i>	24 (21.6)	32 (31.7)	33 (32.4)
<i>C1/C2</i>	63 (56.8)	47 (46.5)	47 (46.1)
<i>C2/C2</i>	24 (21.6)	22 (21.8)	22 (21.6)
<i>Bw4+ (incluindo HLA-A)</i>	86 (77.5)	79 (78.2)	73 (71.6)
<i>Bw4I80+</i>	72 (64.8)	56 (55.4)	58 (56.9)
<i>Somente Bw4T80+</i>	14 (12.6)	23 (22.8)	15 (14.7)
<i>Bw4-</i>	25 (22.5)	22 (21.8)	29 (28.4)
<b>Interações pós-transplante KIR-ligando HLA classe I:</b>			
<b>Dador KIR inibitório + / Recetor com ligando ausente n (%)</b>			
<i>Recetores com todos os ligandos</i>	47 (42.3)	40 (39.6)	31 (30.3)
<i>2DL1+/C2-</i>	24 (21.6)	31 (30.7)	32 (31.4)
<i>2DL2+/C1-</i>	13 (11.7)	8 (7.9)	9 (8.9)
<i>2DL3+/C1-</i>	23 (29.7)	18 (17.8)	17 (16.3)
<i>3DL1+/ Bw4-</i>	24 (21.6)	20 (19.8)	28 (27.4)
<i>Bw4I80-</i>	14 (12.6)	23 (22.8)	15 (14.7)
<b>Dador KIR ativação + / Recetor com ligando presente n (%)</b>			
<i>2DS1+/C2+</i>	24 (21.6)	34 (33.7)	26 (25.5)
<i>3DS1+<sup>§</sup> Bw4+</i>	29 (26.1)	39 (38.6)	32 (31.4)
<i>Bw4I80+</i>	25 (22.5)	28 (27.7)	27 (26.4)

BMDW, Bone Marrow Donors Worldwide. C1, grupo HLA-C(Asn80). C2, grupo HLA-C(Lys80). Bw4I80, motivo Bw4 isoleucina 80. Bw4T80, com treonina 80.

<sup>#</sup> de acordo com a modelo proposto por Cooley S. et al [332] dadores com conteúdo KIR neutro têm genótipos Cen e Tel com nenhum ou 1 motivo B; com conteúdo bom têm 2 ou mais motivos B mas sem o Cen-B/B; com o melhor conteúdo têm 2 ou mais motivos B incluindo o Cen-B/B.

<sup>§</sup> mantém-se elusiva a definição inequívoca dos ligandos específicos do KIR3DS1, contudo têm sido propostos os alotipos HLA-Bw4 como ligandos putativos em que a afinidade é modelada pela forma Bw4I80 e pelo péptido Ag apresentado pela molécula HLA [329].

As diferenças significativas na distribuição de genes e genótipos entre os 3 grupos de transplantes estão indicadas a negrito. De forma a tornar claras estas diferenças, o símbolo de significância é apresentado em ambas as colunas de cada comparação. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

Foi considerada de seguida, a distribuição no pós-transplante de interações entre os recetores KIR do dador e os ligandos do doente. Em relação aos recetores KIR inibitórios, verifica-se que uma fração importante de doentes (entre os 30 e os 42%) apresenta um repertório de ligandos completo (têm um genótipo C1/C2, Bw4+) e consequentemente terão interações do tipo ligando ausente (Tabela 18). Cada uma das interações com ausência do ligando HLA C apresentou uma distribuição similar entre os grupos de doentes. Ainda assim verifica-se algumas pequenas diferenças, o grupo de transplantes relacionados apresentou como interação maioritária a 2DL3+/C1- (29.7%) enquanto nos transplantes não-relacionados foi a 2DL1+/C2- presente em 30.7 e 31.4% dos transplantes com dador local e internacional, respetivamente.

Em relação à interação mediada pelo KIR3DL1 foram avaliados 2 perfis, o primeiro como a ausência completa do ligando Bw4 que apresentou uma frequência entre 19.8 e 27.4%. O segundo perfil definido pela ausência da forma de alta afinidade Bw180 do ligando foi observado em 2.6 a 22.8 % dos transplantes.

Os recetores KIR de ativação 2DS1 e 3DS1 têm sido associados com a evolução dos transplantes por AML. Este efeito, poderá ser o resultado de a ação destes recetores que quando ativados pelos ligandos cognatos, atuam de forma a modelar a educação das células NK, baixando os limiares da ativação das células NK [333, 334]. A distribuição de transplantes com interação KIR2DS1+/C2+ foi entre 21.6% a 33.7%. Em relação ao 3DS1, o ligando deste KIR não está inequivocamente demonstrado. No entanto, é uma molécula com uma homologia estrutural muito extensa com o 3DL1 e por outro lado, tem vindo a ser demonstrada uma associação entre a progressão da infeção HIV em indivíduos 3DS1 e Bw4I80 positivos [335]. Desta forma, tem sido proposta uma interação 3DS1/Bw4 cuja afinidade é provavelmente fortemente modelada pelo péptido Ag presente na molécula HLA. A distribuição nos grupos de doentes desta interação putativa 3DS1/Bw4 e com a forma de maior afinidade Bw4I80, verificou-se entre os 26.1 e 38.6% e os 22.5 e os 27.7% respetivamente.

#### **4.2.1.3.4. Análise da Expressão Genética dos Recetores KIR Durante a Reconstituição do Compartimento de Células NK.**

A expressão de transcritos do repertório germinal dos recetores KIR foi relacionada com a presença dos respetivos ligandos HLA-C grupo C1 ou C2 e os alotipos Bw4 no locus HLA-B e HLA-A, nos recetores de aloenxertos aos 3 meses de evolução.

Todos os indivíduos da série apresentaram no genótipo o 2DL1 e o transcrito foi detetado aos 3 meses independentemente da presença ou não do ligando HLA C1. Já em relação aos genes inibitórios 2DL2, 2DL3 e 3DL1, foram encontrados alguns indivíduos com genótipos positivos para estes genes que não apresentaram expressão, mas que não é correlacionável com a presença/ausência de cada um dos ligandos (tabela 19).

**Tabela 19 – Análise da expressão do repertório KIR em relação à presença do ligando HLA.**

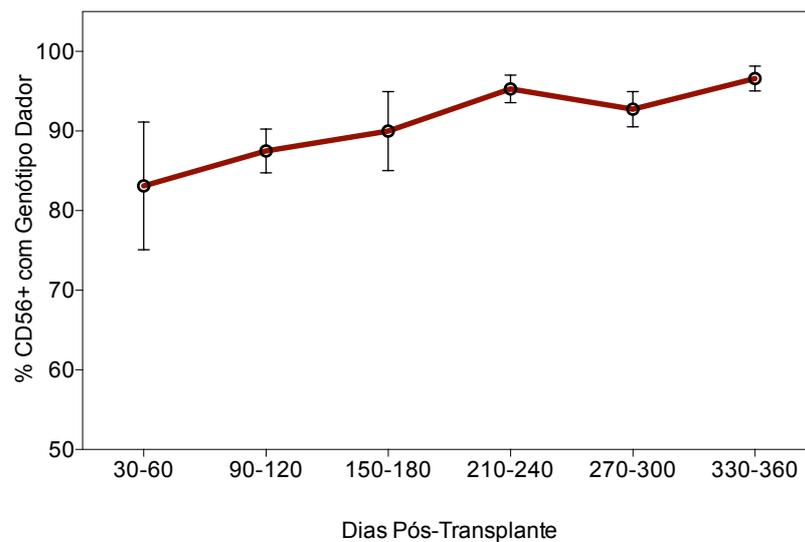
	Frequências		Expressão Genética 3 meses				P
	N	PF	Lig. N (%)	Expr. N (%)	S/Lig. N (%)	Expr N (%)	
<b>Genes Inibitórios/Ligandos</b>							
2DL1/C1	54	1.00	48 (88.9)	48(100)	6 (11.1)	6 (100)	ns
2DL2/C2	29	0.54	26 (89.6)	21 (80.7)	3 (10.4)	2 (66.7)	ns
2DL3/C1	50	0.93	44 (88)	42 (95.5)	6 (12)	6 (100)	ns
3DL1/Bw4	52	0.96	39 (75)	38 (97.4)	13(25)	13 (100)	ns
<b>Genes de Ativação/Ligandos</b>							
2DS1/C1	14	0.26	11 (78.6)	11 (100)	3 (21.4)	3 (100)	ns
2DS2/C2	31	0.57	28 (86.8)	24 (85.7)	3 (100)	3 (100)	ns
3DS1/Bw4	13	0.24	7 (53.8))	7 (100)	6 (100)	6 (100)	ns

N, número de doentes com o gene ou o haplótipo KIR no genótipo; NT, número total de doentes analisados; PF, frequência genética; Lig., ligando HLA presente, S/Lig., ligando HLA não presente, Expr., detetada expressão de RNAm do gene KIR; P, significado da análise comparativa da expressão dos genes KIR na presença ou não dos respetivos ligando; ns, não significativo.

Nos genes de ativação o 2DS1 e 3DS1 apresentaram expressão sempre que presentes no genótipo enquanto a regulação da expressão do 2DS1 não foi associada ao ligando C2.

A expressão dos genes KIR foi também avaliada nestes doentes, aos 6 meses (n=34) e aos 12 meses (n=20), tendo sido detetada a expressão de todos genes KIR integrantes dos genótipos germinais individuais.

No transplante alogénico foi observado um indica um quimerismo misto de 84% ( $\pm 8.5$ ) (média $\pm$ SEM) aos 3 meses, que sobe aos 6 meses e 12 meses para 89.9% ( $\pm 6.6$ ) e 90.8% ( $\pm 5.2$ ) respetivamente (figura 20).



**Figura 20 – Evolução do quimerismo celular na população de células NK.**

As células  $CD3^-CD56^+$  foram separadas por *FACS cell-sorting* e foi quantificada a frequência relativa de células com o genótipo de dador relativamente ao genótipo autólogo. A curva representa a evolução da frequência de células NK do dador que fizeram no sangue periférico da população de doentes em seis intervalos de tempo durante o primeiro ano de evolução. Os pontos representam a média  $\pm$  SEM da frequência de células NK com genótipo do dador.

Tendo em consideração esta evolução foi avaliada as características quiméricas do repertório de transcritos de recetores KIR expresso no pós-transplante e qual a sua evolução.

Esta análise é apresentada na tabela 19 e aponta algumas evidências que sugerem que no pós-transplante os doentes que apresentam algum grau de quimerismo no compartimento celular NK expressam um repertório de recetores KIR misto entre o genótipo KIR autólogo e o genótipo KIR do dador. Por outro lado, verifica-se inicialmente a ausência de expressão de alguns genes que fazem parte de ambos os genótipos dos dadores e dos recetores com tendência para normalizar com a evolução. São exemplos os genes 2DL2 (expressão aos 3 meses, 94.7% dos doentes versus expressão aos 6/12 meses, 100% dos doentes), o 2DL2 (84.5% versus, 95%), o 2DL5 (54.5% versus, 80%), o 2DS1 (85.7% versus 100%) e o 2DS3 (50% versus 80%).

**Tabela 20 – Análise da expressão genética do locus KIR em função das disparidades genotípica entre dadores e recetores para estes genes.**

	R+/D+			R+/D-			R-/D+		
	3m N/Nt (%)	6/12m N/Nt (%)	P	3m N/Nt (%)	6/12m N/Nt (%)	P	3m N/Nt (%)	6/12m N/Nt (%)	P
<b>Genes Estrutura</b>									
2DL4	37/38 (97.4)	54/54 (100)	ns						
3DL2	36/38 (94.7)	54/54 (100)	ns						
<b>Genes Inibitórios</b>									
2DL1	31/32 (96.9)	46/47 (97.9)	ns	2/2 (100)	3/3 (100)	ns	3/3 (100)	4/4 (100)	ns
2DL2	11/13 (84.6)	19/20 (95)	ns	4/9 (44.4)	7/12 (58.3)	ns	5/7 (71.4)	6/6 (100)	ns
2DL3	27/28 (96.4)	40/40 (100)	ns	4/4 (100)	4/6 (66.7)	ns	2/3 (66.7)	6/6 (100)	ns
2DL5	6/11 (54.5)	12/15 (80)	ns	3/6 (50.0)	4/11 (36.4)	ns	3/5 (60)	6/7 (85.7)	ns
3DL1	37/38 (97.4)	56/60 (93.3)	ns	0	0	ns	0	0	ns
<b>Genes de Ativação</b>									
2DS1	6/7 (85.7)	10/10 (100)	ns	2/3 (66.7)	3/7 (42.9)	ns	3/3 (100)	5/6 (83.3)	ns
2DS2	13/13 (100)	19/20 (95.0)	ns	3/8 (37.5)	4/9 (44.4)	ns	8/8 (100)	10/10 (100)	ns
2DS3	2/4 (50.0)	4/5 (80.0)	ns	1/5 (20)	2/8 (25)	ns	0/4 (0.0)	3/5 (60.0)	ns
2DS4	38/38 (100)	54/54 (100)	ns	0	0	ns	0	0	ns
2DS5	5/6 (83.3)	10/10 (100)	ns	2/5 (40)	5/9 (55.6)	ns	3/4 (75)	5/6 (83.3)	ns
3DS1	4/5 (80.0)	7/8 (87.5)	ns	3/4 (75)	3/11 (27.3)	ns	4/5 (80)	5/6 (83.3)	ns

R+, gene presente no genótipo do recetor; R-, recetor com genótipo negativo para o gene; D+, gene no genótipo do dador; D-, recetor com genótipo negativo; 3m, análise da expressão dos genes KIR, 6/12m, análise da expressão dos genes KIR aos 6 e aos 12 meses.

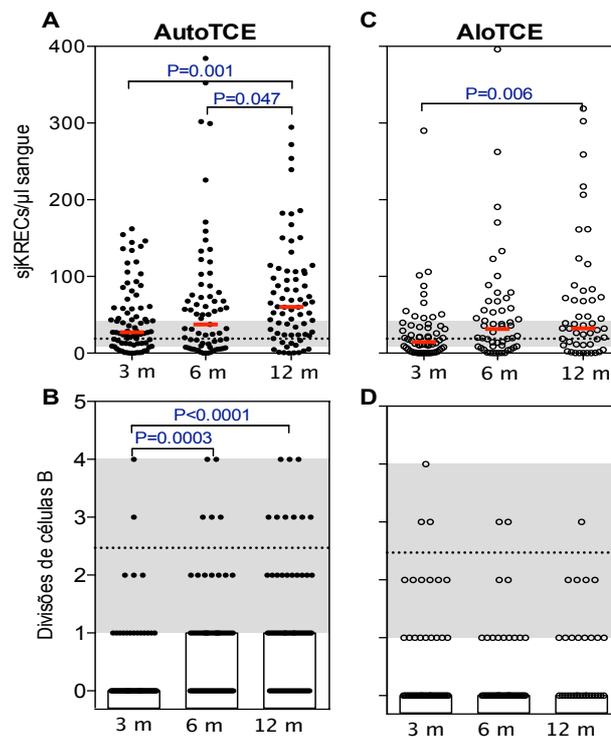
Os genes KIR com disparidade genotípica apresentam uma expressão variada se a disparidade é no sentido do recetor positivo para o gene e o dador negativo. Nos doentes com estas características é encontrada a expressão de genes do recetor aos 3 meses de evolução do transplante e também aos 6 e 12 meses o que está de acordo com o perfil de quimerismo misto encontrado na população de células NK. Quando a disparidade é no sentido do enxerto com genótipo positivo e recetor negativo, é notada uma tendência para um aumento da expressão do repertório KIR específico do enxerto com a evolução do transplante, mas que nesta análise não assume significado

estatístico (tabela 20).

#### 4.2.2. A Recuperação da Linfopoiese B e Reconstituição dos Repertórios Estruturais e Funcionais das Células B

##### 4.2.2.1. A Dinâmica da Linfopoiese B Após o Transplante

Foi avaliada a linfopoiese B após o transplante através da determinação no sangue periférico dos sjKRECs. De acordo com os dados obtidos, o processo de neogénese celular B está restabelecido aos 3 meses de evolução após a transplantação de CEHs (autólogos: 37.3, (7.7-77.4); alogénicos: 14.6, (3.1-35.1) sjKRECs/ $\mu$ l; versus controlo P10-P90: 9.1-42.0) (figuras 21A e C). Nos autoTCEs foi observado um aumento continuado da produção de células B com valores médios de contagens de sjKRECS, aos 12 meses de evolução, superiores ao intervalo normal (60.4, (24.0-106.8)).



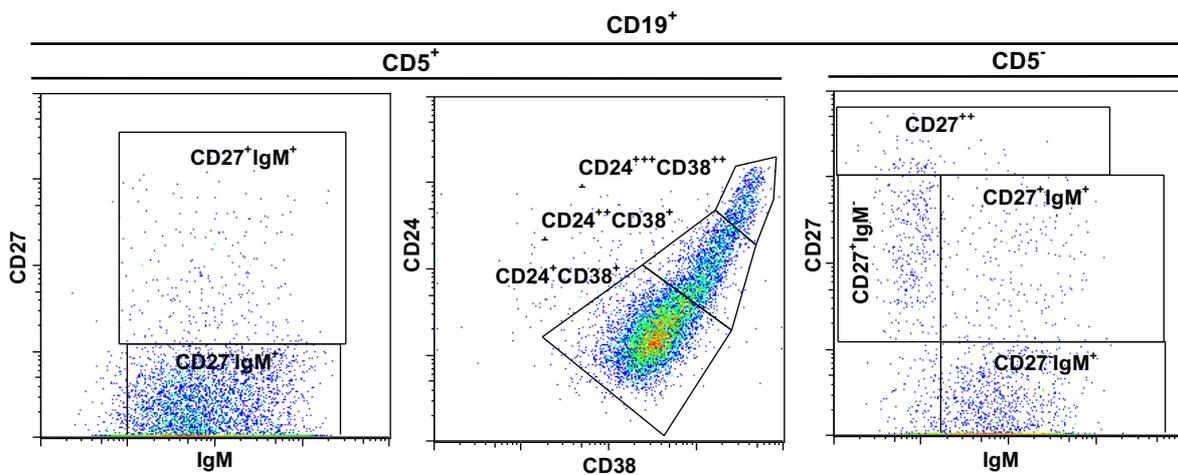
**Figura 21 – Análise seriada da linfopoiese B no primeiro ano após o transplante de CEHs autólogas e alogénicas e avaliação do histórico de divisões celulares do compartimento B periférico.**

Foi quantificado por PCR em tempo real (qPCR) no DNA genómico de células do sangue periférico, o número absoluto de sequências de sjKRECs nos doentes com enxerto autólogo (A) e alogénico (C). Uma estimativa do número de divisões celulares presentes no compartimento de células B periférico total foi obtida como a diferença dos ciclos limiares (Ct) dos qPCRs para as sequências somáticas cjRssKde e as sequências circulares de DNA sjKRECS que resultam do rearranjo K das cadeias leves das Igs nos doentes com autoTCE (B)

e aloTCE (D). Nos gráficos de dispersão, cada ponto representa um valor individual, as barras as medianas da distribuição de valores e as áreas sombreadas o intervalo normal estabelecido como o P10-P90 (9.1-42) da distribuição dos valores obtida na população controlo. As variações entre tempos de análise foram comparadas com o teste de Mann-Whitney e são indicados os valores significativos. A correlação entre sjKRECs e células B transitórias foi estabelecida com o teste não paramétrico rho de Spearman.

A relação quantitativa entre os marcadores genéticos sjKRECs não sujeitos a duplicação com a divisão celular e a sequência de junção da codificação RssKde retida no DNA cromossómico replicada com a mitose celular permite estimar a quota de divisões celulares do compartimento circulante de células B. Em ambos os grupos foi observada uma baixa taxa de proliferação celular (figura 21 B e D). Os doentes submetidos a autotransplante apresentaram um aumento significativo do número de divisões celulares aos 6 meses de evolução (1.0, 0.0-1.0;  $P < 0.0003$ ) (figura 21C). Já os doentes com transplante alogénico não mostraram qualquer variação significativa na taxa de divisões celulares do compartimento de células B (figura 21D).

#### 4.2.2.2. Análise da Maturação e Diferenciação das Células B Após o Transplante



**Figura 22 – Análise da heterogeneidade das populações periféricas de células B.** As células do sangue periférico foram analisadas por citometria de fluxo de forma a definir em primeiro lugar as frações de linfócitos B  $CD19^+CD5^+$  e  $CD5^-$ . As células B  $CD5^+$ , foram selecionadas para a análise da expressão diferencial do CD27 e da IgM e quantificadas como  $CD27^-$  (células B transitórias/pré-naíves),  $CD27^+IgM^+$  (células putativas B-1a ou produtoras de IgM natural) e do CD24 e do CD38 para a definição dos fenótipos dos estádios transitórios  $CD24^{+++}CD38^{+++}$  (T1),  $CD24^{++}CD38^{++}$  (T2) e  $CD24^+CD38^+$  (T3/pré-naíve). As células B  $CD5^-$  foram estudadas como as subpopulações funcionais  $CD27^-IgM^+$  (células naíve),  $CD27^+IgM^+$  (células de memória IgM e com capacidade de mudança de isótipo),  $CD27^+IgM^-$  (células de memória com mudança de isótipo das Igs) e  $CD27^{++}$  (plasmablastos em trânsito).

A diferenciação das células B durante o período de análise foi realizada através da caracterização de dois compartimentos celulares B periféricos, o compartimento celular

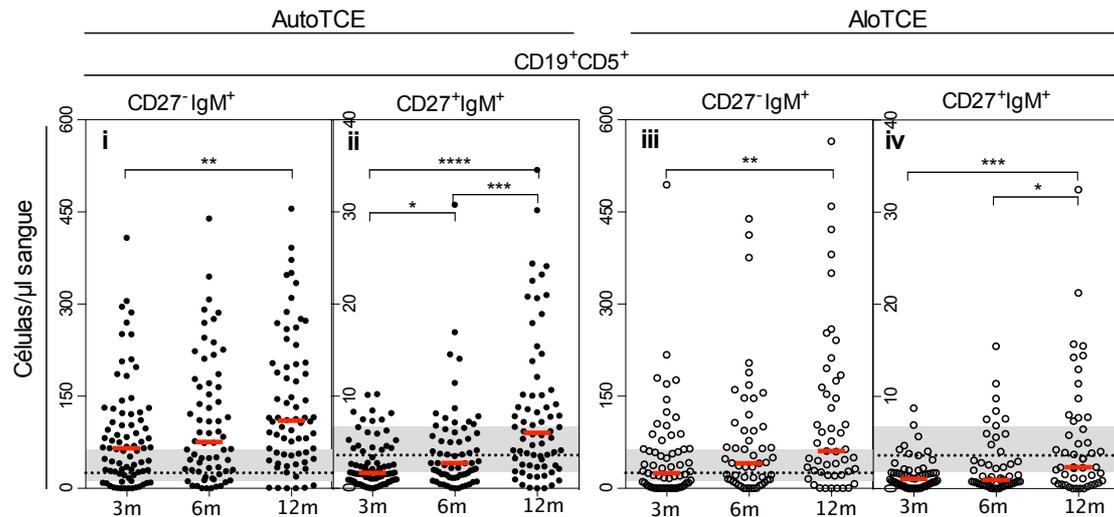
CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, constituído maioritariamente por células B transicionais e pré-naíves e o compartimento CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> que contém as células naíves maduras e as populações de células B terminalmente diferenciadas de memória e plasmablastos (figura 22).

#### **4.2.2.2.1. A Recuperação das Contagens Absolutas de Células B e a Expansão do Compartimento de Células CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>**

Os doentes em processo de recuperação de um transplante autólogo apresentaram uma contagem média de células B CD19<sup>+</sup> no intervalo normal aos 6 meses de evolução (128.4, 46.7-269.2; controlo: 84.6-302 cél./ $\mu$ l). No entanto, apesar desta normalização numérica a composição do compartimento periférico de células B apresentou alterações significativas. A proporção de células CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (relativas ao total de células CD19<sup>+</sup>) é de 65.8% (54.1-75.7) o que constitui um valor muito superior ao encontrado na população controlo (19.8%, 8.7-38.2) ( $P < 0.0001$ ). Os doentes com enxerto alogénico apresentaram uma recuperação quantitativa das células B somente aos 12 meses de evolução (119.0, 64.2-309.0 cél./ $\mu$ l). O compartimento de células B destes doentes, apresentou tal como tem vindo amplamente descrito para este tipo de transplante [336, 337], uma expansão muito forte e prolongada da fração de células B CD5<sup>+</sup>. De facto, em média mesmo aos 12 meses de evolução, mais de metade das células B circulantes destes doentes apresentaram o fenótipo células CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (54.1%, 30.1-63.9).

A diferenciação do compartimento de células B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> foi avaliada considerando a expressão diferencial do marcador CD27. Desta forma foi estabelecido o fenótipo CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup> que caracteriza as subpopulações de células B transicionais e o fenótipo CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> que tem sido proposto, embora com alguma controvérsia, caracterizar uma população de células B do tipo B1a produtoras de IgM natural, polireativa e poliespecífica [338-340].

Os doentes com autoenxertos evidenciaram uma expansão muito larga do compartimento transicional CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup> particularmente evidente aos 12 meses de evolução (110.3, (54.9-204.1); controlo: 12.1-64.0 cél./ $\mu$ l) (figura 23Ai).



**Figura 23 – Análise quantitativa do compartimento de células B  $CD19^+CD5^+$  após o transplante de CEHs.**

(A) contagens celulares aos 3, 6 e 12 meses da subpopulação de células B imaturas  $CD19^+CD5^+CD27^-$  após auto e aloTCE (i e iii, respetivamente) e da fração celular com expressão de CD27 e IgM, produtora provável de Ig natural poliespecífica (ii e iv, auto e aloTCE, respetivamente). (B) São mostrados os valores individuais como pontos e a mediana da distribuição dos valores como barra. As áreas sombreadas definem o intervalo normal na população controlo. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as contagens e proporções celulares entre tempos de análise e são indicadas as diferenças significativas. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.5$ .

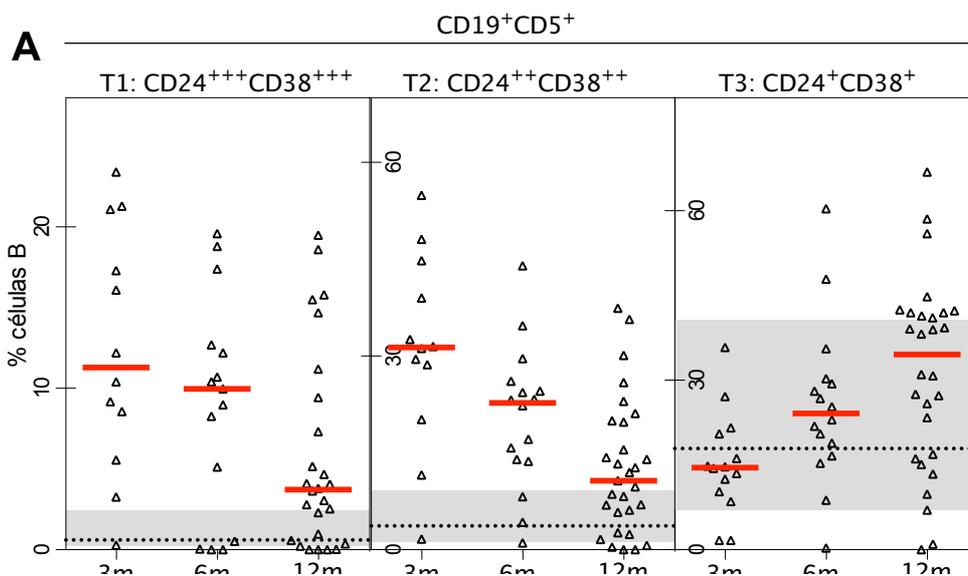
No grupo de doentes com aloenxerto, as células  $CD19^+CD5^+CD27^-IgM^+$  apresentam contagens no intervalo normal em todo o período de análise (figura 23Aiii). Desta forma, a alteração qualitativa do compartimento celular B, observada nestes doentes, deve-se principalmente a uma redução muito profunda das frações celulares maduras. Em relação às células com fenótipo de maturação terminal  $CD19^+CD5^+CD27^+IgM^+$ , os doentes autólogos apresentaram uma recuperação dos níveis destas células recuperam logo aos 3 meses de evolução (figura 23Aii). Por seu lado, os doentes com enxerto alógeno somente recuperaram o nível de células  $CD19^+CD5^+CD27^+IgM^+$  aos 12 meses de evolução (figura 23Aiv).

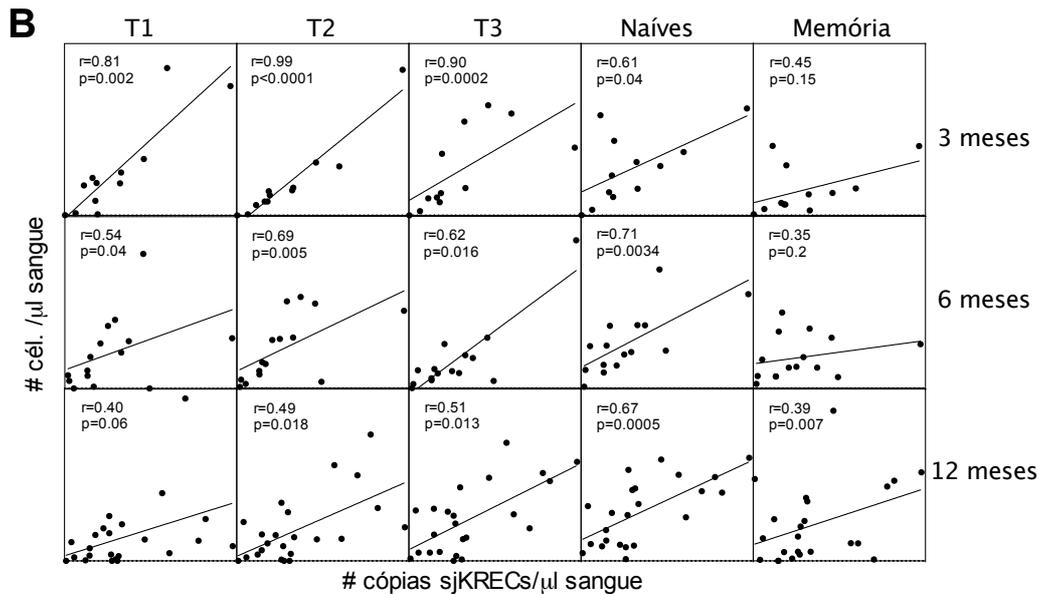
#### 4.2.2.2.2. O Desenvolvimento do Compartimento de Células B Transicionais

De seguida, foi avaliado o processo de maturação do compartimento B transicional  $CD19^+CD5^+$  pela análise, tal como descrito, da expressão diferencial do CD24 e CD38 nestas células [186, 187] (figura 24A). Nos doentes transplantados foi encontrada uma inversão das proporções relativas das subpopulações de células B transicionais mais imaturas comparativamente ao controlo. As frações T1 e T2 apresentaram uma

frequência mais

elevada na fase mais precoce da evolução dos transplantes (fração T1: 3 meses, 11.3% (6.3-20.2); 6 meses, 10.0% (0.5-12.7 versus intervalo normal, 0.2-2.4%), (fração T2: 3 meses, 31.3% (22.3-43.3); 6 meses, 22.7% (13.8-25.7 versus intervalo normal, 1.3-9.42%). Com a evolução dos transplantes, houve um decréscimo da frequência destas células no sentido dos valores normais (T1: 12 meses, 3.7% (0.5-9.8); T2: 12 meses, 10.7% (4.2-19.9). Concomitantemente, observou-se um aumento progressivo da frequência da fração T3 (T3: 3 meses, 14.6% (9.8-20.8); 6 meses, 24.2% (17.2-30.8); 12 meses, 34.6% (16.3-42.0) versus intervalo normal 7.0-40.6%). Tendo como indicador esta diferenciação fenotípica, procedeu-se à avaliação da quantificação de sjKRECs como um indicador do processo de maturação e desenvolvimento do compartimento de células B durante a reconstituição imunológica apos o transplante. A cada tempo de análise foi verificada a correlação entre o número de cópias de sequências sjKRECs detetadas no sangue periférico e o número absoluto de células de cada subpopulação de linfócitos B imaturos e das populações maduras com o fenótipo naíve  $CD19^+CD5^+CD27^+IgM^+$  e de memória  $CD19^+CD5^+CD27^+$ . A matriz gráfica da avaliação destas correlações é apresentada na figura 24B.





**Figura 24 – Análise da composição do compartimento de células B transitórias e avaliação da correlação do seu desenvolvimento com a quantificação de sjKRECs após o transplante de CEHs.**

A) Proporções das frações celulares nos estádios de diferenciação transitória T1:  $CD24^{+++}CD38^{+++}$ , T2:  $CD24^{++}CD38^{++}$ , e T3/pré-naíve:  $CD24^{+}CD38^{+}$ . B) Diagramas de dispersão representando a matriz de correlação com a relação entre o número de cópias de seqüências sjKRECs detetadas no sangue periférico e o número absoluto das subpopulações de células B imaturas (T1, T2 e T3) e maduras (naíves  $CD19^{+}CD5^{-}CD27^{+}IgM^{+}$  e memória  $CD19^{+}CD5^{-}CD27^{+}$ ). São mostrados os valores individuais como pontos e a mediana da distribuição dos valores como barra. As áreas sombreadas definem o intervalo normal na população controle. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as contagens e proporções celulares entre tempos de análise e são indicadas as diferenças significativas. \*\*\*\* $P<0.0001$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.5$ . A correlação entre o número de cópias sjKRECs e as contagens absolutas de subpopulações celulares B foi estabelecida com o teste não paramétrico rho de Spearman.

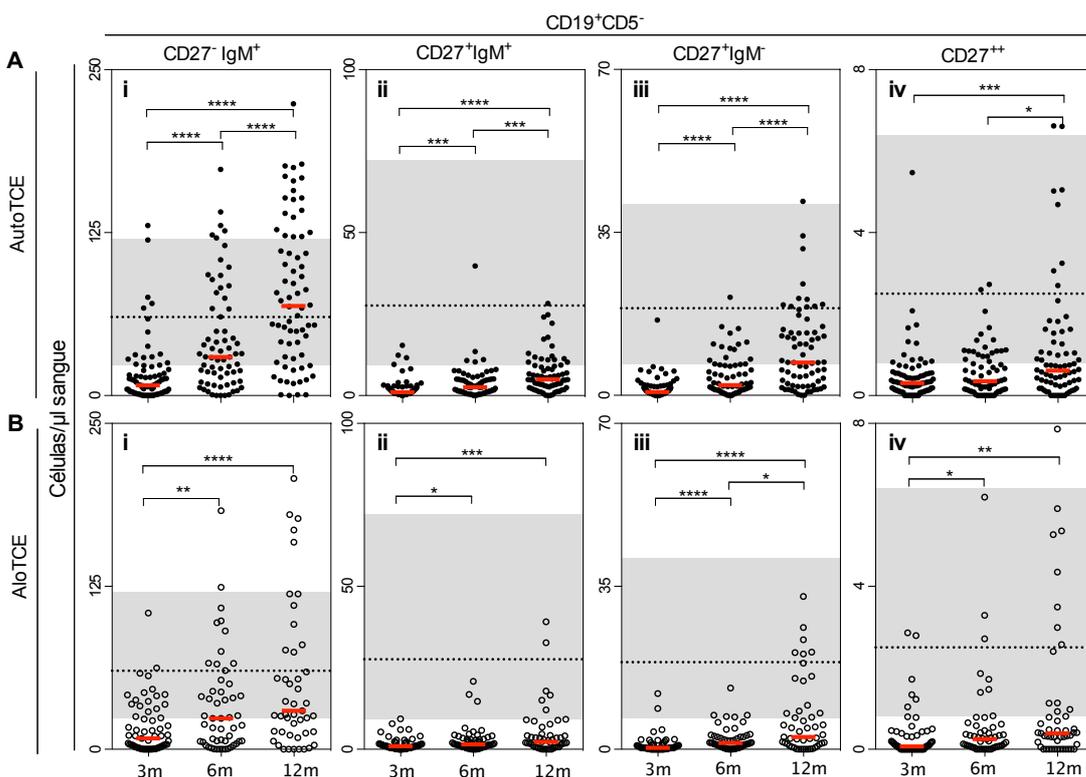
Com esta análise verificou-se que aos 3 meses de evolução existe uma correlação linear positiva muito forte entre os números de sjKRECs e as frações de células B transitórias (T1:  $r=0.81$ ,  $p=0,002$ , T2:  $r=0.99$ ,  $p<0,0001$  e T3:  $r=0.90$ ,  $p=0,0002$ ). Aos 6 meses de evolução o significado da proporcionalidade entre os 2 fatores desloca-se no sentido das frações T2 e T3 e também para a fração madura naíve (figura 24B). Aos 12 meses surge com a maior proporcionalidade e significado a correlação entre o valor absoluto de células B naíves e os sjKRECs enquanto para as populações mais imaturas deixa de existir uma correlação linear.

É importante notar, que tal como esperado, as populações de células B mais maduras, que sofreram várias divisões durante o processo de desenvolvimento não apresentam em nenhum dos tempos de análise uma correlação com os sjKRECs.

#### 4.2.2.2.3. A Recuperação do Compartimento de Células B Maturas

O focus seguinte da análise da recuperação do compartimento linfocitário B, foram as subpopulações celulares do compartimento  $CD19^+CD5^-$ , que compreende as células maduras naïves com capacidade de reconhecimento dos Ags cognatos e as células B respondedoras que fizeram o processo de educação antigénica. Ambos os grupos de doentes restabeleceram as contagens celulares da subpopulação B naïve  $CD27^-IgM^+$  para o intervalo normal durante o primeiro ano de evolução dos transplantes (autoTCE: 68.8, (29.45-122.1); aloTCE: 32.2, (13.2-112.6); controlo: 23.7-120.3  $cél./\mu l$ ) (figuras 25Ai e 25Bi). Em relação às subpopulações celulares B de memória,  $CD27^+IgM^+$  e  $CD27^+IgM^-$ , aos 3 meses de evolução, foi observada uma citopenia acentuada destas populações em ambos os grupos de doentes (figuras 25A e 25B, ii e iii).

Aos 12 meses de evolução, as contagens de células  $CD27^+IgM^+$  observadas nos dois grupos de doentes, foram significativamente inferiores ao intervalo normal (autoTCE: 5.0, (2.6-9.2); aloTCE: 2.3, (0.7-5.8); intervalo normal: 9.3-72.3) (figuras 25Aii e 25Bii).



**Figura 25 – Reconstituição dos repertórios de células B maduras naïves e de memória após o transplante autólogo e alogénico de CEHs.**

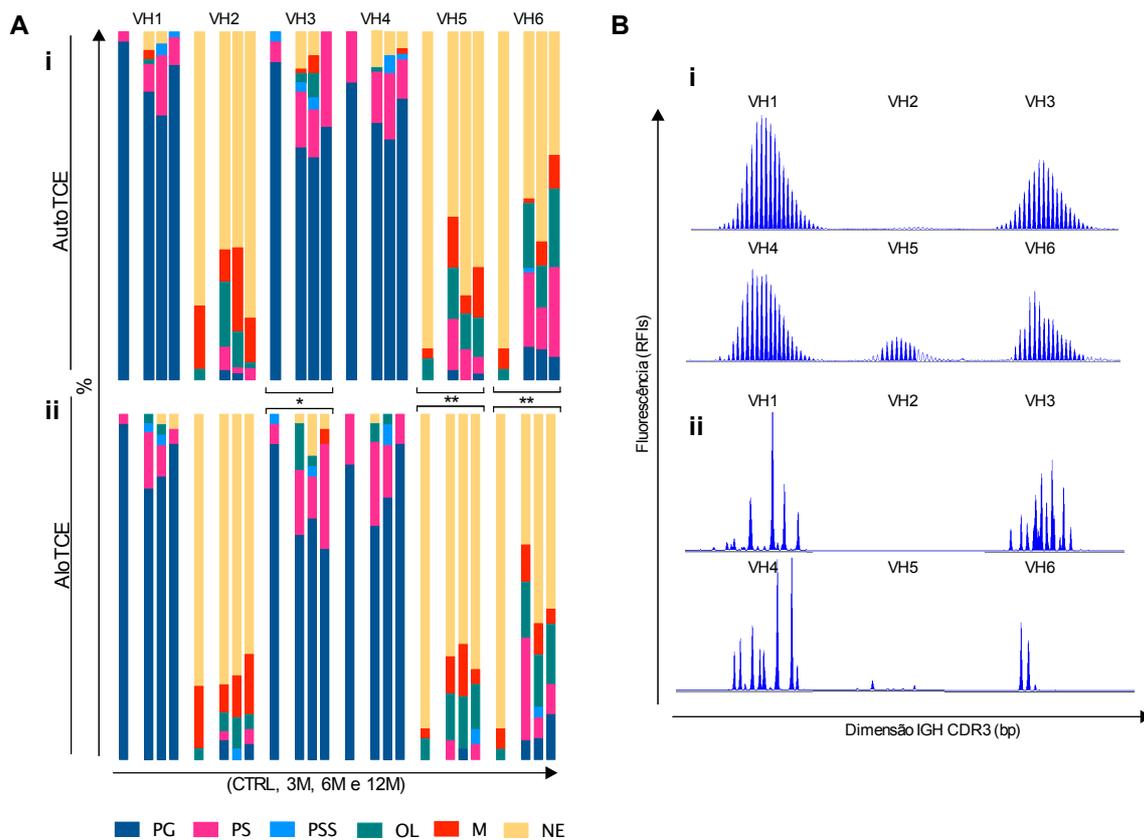
O compartimento de células B  $CD19^+CD5^-$  foi analisado com base na expressão diferencial do CD27 e da IgM nas subpopulações celulares maduras. (A) quantificação seriada da população de células B naïves ( $CD27^-IgM^+$ ) (i), das populações de memória IgM e células com capacidade de mudança isotípica ( $CD27^+IgM^+$ ) (ii), das células de memória que fizeram mudança isotípica da Ig ( $CD27^+IgM^-$ ) (iii) e da pequena fração de plasmablastos em circulação ( $CD27^{++}$ ) (iv) aos 3, 6 e 12 meses após o transplante autólogo. (B) As contagens celulares das mesmas

subpopulações de células B na população de doentes com transplante alogénico. São representados os valores individuais como pontos e a mediana da distribuição dos valores como a barra vermelha. As áreas sombreadas definem o intervalo normal na população controlo. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as contagens celulares entre tempos de análise e são indicadas as diferenças significativas. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

A população CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>, apresentou um valor médio próximo do limite inferior do intervalo normal nos doentes com enxerto autólogo, mas os doentes com transplante alogénico apresentaram ainda valores abaixo do mesmo intervalo (autoTCE: 7.0, (2.0-13.5); aloTCE: 2.6, (0.7-8.0); intervalo normal: 6.6-41.0 cél./ $\mu$ l) (figuras 25Aiii e 25Biii). Ao longo do período de análise incluindo o ponto final, as contagens de plasmablastos nos dois grupos de doentes não atingiram valores no intervalo normal (autoTCE: 0.6, (0.2-1.3); aloTCE: 0.4, (0.03-1.0); intervalo normal: 0.8-6.4 cél./ $\mu$ l) (figuras 25Aiv e 25Biv).

#### 4.2.2.3. A Diversidade Estrutural do Repertório das Células B Após o Transplante

Foi analisada a diversidade estrutural dos CDR3 *IGH* dos transcritos IgM de forma a estabelecer se o repertório estrutural é alvo de alguma restrição ou perturbação durante a recuperação imunológica pós-transplante. Em linha com o anteriormente descrito [341, 342], em ambos os grupos de doentes e nos controlos, as famílias de segmentos genéticos com o maior número de genes funcionais *IGVH1*, 3 e 4 constituem a maior parte do repertório estrutural de rearranjos VDJ da *IGH* usados na transcrição da IgM. De facto, os *spectratypes* destas famílias de segmentos mostraram não só as fluorescências mais elevadas, mas também a maior complexidade com o maior número de picos (figura 26A e B). Por comparação com o grupo controlo, em ambas as séries de transplantes autólogos e alogénicos foi observado um determinado grau de perturbação do repertório estrutural destes segmentos *IGVH1*, 3 e 4 (figuras 26Ai e ii, respetivamente). Estas diferenças atingiram um significado estatístico marginal somente para a família de genes *IGVH3* ( $P < 0.05$ ). Adicionalmente foi visto que, repertórios *IGH* altamente distorcidos com perfis oligoclonais ou monoclonais eram característicos de doentes com contagens totais de células CD19<sup>+</sup> mais baixas comparativamente aos doentes com repertórios *IGH* com maior diversidade estrutural (40.8, (6.9-107.1) versus 206, (90.4-351.3) cél./ $\mu$ l, respetivamente;  $P < 0.0001$ ).



**Figura 26 – Repertório estrutural IGH no pós-transplante de CEHs autólogos e alogénicos.**

(A) Repertórios IGHM expressos nos doentes com transplante autólogo (i) e alogénico (ii). A diversidade dos CDR3 IGHM foi analisada por *spectratyping* para estabelecer as frequências dos perfis de complexidade estrutural para cada uma família dos segmentos variáveis IGVH 1 a 6. Os perfis foram classificados com base no número de picos, forma da distribuição dos picos e intensidade da fluorescência como policlonal gaussiano (PG), policlonal distorcida (PS), policlonal severamente distorcida (PSS), Oligoclonal (OL), monoclonal (MO) e não expressa (NE) de acordo com a definição estabelecida na tabela 12. As barras com as diferentes cores de cada coluna representam a frequência média de cada um dos perfis para cada família IGH tal como definido na legenda. As primeiras colunas de cada família de genes IGHV representam o perfil obtido para a população de controlo, seguida da análise em cada grupo de doentes aos 3, 6 e 12 meses após o transplante. (B) padrões representativos de um perfil normal de um 'spectratype' CDR3 IGHV-IGCM indicativo da expressão de um repertório diverso nas principais famílias de segmentos IGVH (i) e de um repertório severamente distorcido encontrado neste estudo nos doentes com uma recuperação muito fraca das contagens totais de células B. O primeiro perfil é caracterizado por uma distribuição contínua de picos com forma gaussiana, que representa os fragmentos de DNA obtidos por PCR separados por 3 pares de bases. O segundo perfil apresenta picos dominantes e falhas na distribuição indicativas de um pool de células B maioritariamente oligoclonal e, portanto, com uma diversidade estrutural restrita. As diferenças entre os perfis dos controlos e doentes, e nestes, nos diferentes pontos de análise foram testados com um teste exato de Fisher e são mostradas as diferenças significativas. \* $P < 0.5$ , \*\* $P < 0.01$ .

Numa análise global, foi também observada, uma tendência para um aumento da

complexidade e diversidade do repertório com a evolução dos transplantes (figuras 26Ai e ii).

Finalmente, foi também significativa a maior expressão e mesmo a maior complexidade relativa das famílias com baixo número de segmentos *IGVH5* e 6 nos doentes de ambos os grupos comparativamente ao controlo ( $P < 0.001$ ) (figuras 26Ai e ii).

#### **4.2.2.4. Fatores Pré e Pós-Transplante com Impacto na Recuperação das Subpopulações de Células B com Maturação Funcional.**

Foi analisado o impacto dos vários fatores demográficos e clínicos que caracterizam ambos os grupos de doentes, sobre a capacidade de estes fazerem a recuperação das populações de células B maduras  $CD5^+CD27^+$ ,  $CD5^-CD27^-IgM^-$ ,  $CD5^-CD27^+IgM^+$ ,  $CD5^-CD27^+IgM^-$  e  $CD5^-CD27^{++}$ .

Na avaliação aos 3 e aos 6 meses uma proporção muito significativa dos doentes (>80%) de ambos os grupos apresentou contagens das frações de células B maduras inferiores ao intervalo normal. Desta forma, a análise da reconstituição das populações de células B maduras foi efetuada sobre os doentes que fizeram o ponto de análise final do estudo, aos 12 meses de evolução. Os fatores pré e pós-transplante permitiram a classificação categórica dos doentes em grupos e foi definida a recuperação de cada subpopulação celular B, como, uma contagem de células aos 12 meses de evolução superior ou igual ao percentil 10 da população controlo.

A tabela 21 apresenta os fatores correlacionados com a recuperação de uma ou mais populações de células B maduras.

Na população de doentes com enxerto autólogo, a idade dos doentes revelou-se um fator importante. Os doentes com idade inferior a 18 anos apresentaram uma maior capacidade de recuperação das populações celulares B de memória  $CD5^-CD27^+IgM^{+/-}$  e terminalmente diferenciadas  $CD27^{++}$ , quando comparados com doentes de idade mais avançada (>50 anos), ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0036$  e  $P = 0.0265$ , respetivamente) (tabela 17). Na população de doentes com transplante autólogo, foi ainda verificada uma associação entre a recuperação das populações de células B terminalmente diferenciadas  $CD5^+CD27^+$  e  $CD5^-CD27^{++}$  e uma menor incidência de infeções virais ( $P = 0.03$  e  $P = 0.02$ , respetivamente).

**Tabela 21 – Fatores clínicos e pós-transplante condicionantes da recuperação dos repertórios maduros funcionais de células B enxertos autólogos e alogênicos após 12 meses de evolução.**

Fatores	N	CD19 <sup>+</sup>		CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup>							
		CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>		CD27 <sup>-</sup> IgM <sup>+</sup>		CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>		CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup>		CD27 <sup>++</sup>	
		n	P	n	P	n	P	n	P	n	P
		OR (95%CI)		OR (95%CI)		OR (95%CI)		OR (95%CI)		OR (95%CI)	
<b>Tx Autólogo</b>											
<b>Idade</b>											
<18	10	10	Ns	9	ns	9	<0.0001	9	0.004	8	0.03
>55	30	26		20		4	61 (6-617)	11	16.3 (1.8-147)	11	7.2 (1.3-40)
<b>Inf. Virais</b>											
+	8	5	0.03	5	ns	0	ns	3	ns	0	0.02
-	61	57	0.1 (0.02- 0.7)	49		17		33		27	0.1 (0.004-1.3)
<b>sjKRECs*</b>											
3m >P50	41	39	0.03	35	ns	14	ns	23	ns	19	ns
3m <P10	14	10	7.8 (1.2-49)	8		1		6		3	
6m >P50	41	39	0.03	38	0.0005	16	0.003	25	0.02	22	0.01
6m <P10	15	11	7.1 (1.1-44)	7	14.5 (3.1-68)	0	20 (1.2-358)	4	4.7 (1.3-17)	2	7.5 (1.5-38)
<b>Cél. Transicionais CD19+CD5+CD27- *</b>											
3m >P50	49	47	0.01	42	0.02	15	ns	28	ns	22	ns
3m <P10	13	9	10.4 (1.7-65.9)	7	5.1 (1.3-19)	1		4		3	
6m >P50	49	45	Ns	41	0.03	16	ns	27	ns	24	ns
6m <P10	7	5		3	6.8 (1.3-36)	0		2		0	
<b>Cél. CD4+**</b>											
CD4+ >P50	37	35	Ns	33	0.02	11	ns	26	0.01	17	ns
CD4+ <P25	16	14		8	8.2 (2.0-34)	2		5	5.2 (1.5-18)	3	

**Tx Alogénico****Regime de condicionamento**

ATG-	22	13	ns	11	0.04	4	ns	6	ns	5	ns
ATG+	25	19		20	0.2 (0.1-0.9)	2		9		10	

**sjKRECs\***

3m >P50	24	19	0.01	20	0.005	5	ns	11	0.03	10	ns
3m <P10	14	5	6.8 (1.6-30)	5	9 (1.9-42)	0		1	11 (1.2-98)	3	
6m >P50	28	22	0.02	23	0.002	6	ns	13	0.02	12	ns
6m <P10	15	6	5.5 (1.4-22)	5	9.2 (2.2-39)	0		1	12 (1.4-105)	2	

**Cél. Transicionais CD19+CD5+CD27- \***

3m >P50	31	25	0.002	23	ns	5	ns	12	ns	12	ns
3m <P10	14	4	10 (2.4-45)	7		1		2		1	
6m >P50	30	24	0.001	24	0.01	5	ns	12	ns	11	ns
6m <P10	12	3	12 (2.5-58)	7	12 (2.5-58)	1		2		4	

**Cél. CD4+\*\***

CD4+ >P50	25	22	0.02	19	ns	6	ns	13	0.04	11	ns
CD4+ <P25	13	6	8.6 (1.7-44)	8		0		2	6 (1.1-33)	3	

N, número total de doentes agrupados por cada fator de análise; n, número de doentes com contagens absolutas de cada subpopulação B superior ao limite mínimo do intervalo normal (P10 da população controlo), a diferença com N representa o número de doentes que não fizeram a recuperação; OR (95%CI), odds Ratio e intervalo de confiança 95%.

\* Doentes agrupados com base nos níveis de sjKRECs e células transicionais como apresentando contagens <P10 e >P50 dos valores normais (estabelecidos a partir da população controlo) aos 3 e 6 meses de evolução dos transplantes.

\*\* Doentes agrupados com base nas contagens de células CD4+ (<P25 e >P50 estabelecidos a partir da distribuição total ordenada em cada população de doentes) aos 12 meses pós-transplante.

Na população de doentes com enxerto alogénico, o único fator pré-transplante que surgiu associado a uma diminuição da capacidade de recuperação da população celular naïve  $CD5^-CD27^+IgM^+$  foi o uso de imunoglobulina anti-timócito (ATG) no regime de condicionamento ( $P=0.04$ ).

Muito interessante, foram as correlações encontradas para ambas as populações de doentes, entre os níveis de sjKRECs e células transicionais apresentados na primeira fase da evolução dos transplantes, e a capacidade de recuperação das células B maduras aos 12 meses de evolução (tabela 21). De facto, nos doentes com enxerto autólogo, que aos 3 e em particular aos 6 meses de evolução, apresentaram os níveis mais elevados de sjKRECs ( $>P50$  do controlo), a proporção dos que apresentaram as populações maduras de células B com contagens normais, é significativamente maior que no grupo de doentes com os níveis mais baixos ( $<P10$ ) deste marcador ( $CD5^+CD27^+$ ,  $P=0.038$ ;  $CD5^-CD27^-IgM^+$ ,  $P=0.0005$ ;  $CD5^-CD27^+IgM^-$ ,  $P=0.0028$ ;  $CD5^-CD27^+IgM^+$ ,  $P=0.019$  e  $CD5^-CD27^{++}$ ,  $P=0.013$ ). Uma correlação similar, foi observada na população com transplante alogénico para as populações de células  $CD5^+CD27^+$  ( $P=0.019$  e  $P=0.001$ , respetivamente, com os níveis de sjKRECs aos 3 e aos 6 meses),  $CD5^-CD27^-IgM^+$  ( $P=0.005$  e  $P=0.002$ ) e  $CD5^-CD27^+IgM^-$  ( $P=0.03$  e  $P=0.02$ ) (tabela 21).

Foi também estabelecida uma avaliação dos níveis de células transicionais aos 3 e 6 meses, como fator indicativo da recuperação da maturidade do compartimento de células B aos 12 meses de evolução, tendo-se verificado uma correlação menos consistente, na medida em que foi observado impacto na recuperação de somente algumas populações de células (tabela 21).

Adicionalmente, foi observada uma forte correlação em ambas as populações de doentes, entre os níveis de células T  $CD4^+$  (foram comparados os doentes com contagens inferiores ao P10, com os com contagens acima do P50 da distribuição na população) aos 12 meses de evolução e a capacidade de recuperação da população de células B de memória  $CD5^-CD27^+IgM^-$  que resultam precisamente das reações GC mediadas pelas células T  $CD4^+$  foliculares (Thf).

O desenvolvimento de GvHD na forma aguda (aGvHD) e também na forma crónica (cGvHD) é um fator com um forte impacto negativo na reconstituição do compartimento linfóide B [343-345]. Na população de doentes com transplante alogénico deste estudo, a incidência das formas graves aGvHD de grau III e IV e de cGvHD, foi relativamente baixa. Na população total de doentes avaliados, somente 2 (3%) doentes desenvolveram aGvHD de grau IV e 4 (6%) manifestaram cGvHD. Quanto à forma menos extensa de aGvHD grau I e II, foram afetados 13 doentes (20.9%).

**Tabela 22 – Análise do impacto da GvHD sobre a linfopoiese B e desenvolvimento das populações de células B com diferenciação funcional.**

Contagens celulares das Populações		noGvHD	aGvHD I-II	P*	aGvHD IV P**	cGvHD	P***
<b>6 meses</b>	<b>n</b>	35	13		2	4	
<b>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup></b>	<b>CD27<sup>-</sup></b>	50.1 (15-107)	35.1 (6.6-124)	ns	0 0.01	0.4 (0.1-4.1)	0.001
	<b>CD27<sup>+</sup></b>	1.3 (0.6-5.6)	0.7 (0.2-2.5)	ns	0 0.003	0.2 (0.1-0.5)	0.006
<b>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup></b>	<b>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup></b>	25.8 (6.4-65.3)	24.5 (18-75.3)	ns	0 0.01	0.7 (0.1-2.6)	0.003
	<b>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup></b>	1.8 (0.7-4.2)	1.52 (0.5-4.0)	ns	0 0.02	0.5 (0.1-1.0)	0.04
	<b>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup></b>	1.3 (0.6-3.1)	1.9 (0.2-2.5)	ns	0 0.01	0.5 (0.1-1.0)	ns
	<b>CD27<sup>++</sup></b>	0.3 (0.05-0.62)	0.2 (0.05-1)	ns	0 ns	0.1 (0.04-0.4)	ns
<b>sjKRECs</b>		37.0 (9.7-68.8)	35.5 (8.9-72)	ns	0 0.01	0.7 (0.5-33.3)	0.04
<b>12 meses</b>	<b>n</b>	31	13		0	4	
<b>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup></b>	<b>CD27<sup>-</sup></b>	77.0 (29-212)	60.0 (21-150)	ns	-	13.7 (0.2-44.3)	0.049
	<b>CD27<sup>+</sup></b>	3.9 (0.6-8.0)	2.2 (0.7-4.8)	ns	-	1.0 (0.2-4.0)	ns
<b>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup></b>	<b>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup></b>	35.4 (12-119)	25.6 (18.0-75.3)	ns	-	79.9 (0.2-497)	ns
	<b>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup></b>	3.0 (0.8-8.7)	1.9 (0.6-3.9)	ns	-	3.7 (0.2-26.2)	ns
	<b>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup></b>	4.8 (1.3-14.7)	1.6 (0.7-6.2)	ns	-	1.0 (0.1-16.0)	ns
	<b>CD27<sup>++</sup></b>	0.4 (0.01-1.0)	0.4 (0.1-1.6)	ns	-	0.5 (0.1-4.6)	ns
<b>sjKRECs</b>		30.2 (11.4-83.6)	45.0 (8-77)	ns	-	37.2 (0.3-139)	ns

GvHD, doença de enxerto contra hospedeiro; noGvHD, doentes sem GvHD nas formas aguda ou crónica durante o período de avaliação de 12 meses; aGvHD I-II, com GvHD aguda de extensão baixa; aGvHD IV, com GvHD aguda grave e extensa; cGvHD, com GvHD crónica. Os valores representam a contagem absoluta de cada população celular ou de sjKRECs (mediana (IQR)/µl sangue) aos 6 e 12 meses após o transplante. P, valor da comparação das contagens de cada população celular entre doentes livres de GvHD e doentes com GvHD I-II (\*), com GvHD IV (\*\*) e cGvHD (\*\*\*).

Nos doentes afetados pelas formas graves aGvHD grau IV e cGvHD, foi observado aos 6 meses, um deficit profundo da linfopoiese B (tabela 22). Neste ponto de avaliação os dois doentes afetados com aGvHD IV apresentaram um citopenia total para todas as subpopulações linfocitárias B. Nos doentes afetados pela forma crónica desta complicação imunológica foram observadas contagens significativamente mais baixas para várias subpopulações celulares. Os dois doentes com aGvHD IV não

sobreviveram até ao ponto de análise aos 12 meses. Já em relação aos doentes com cGvHD, aos 12 meses de evolução, dois dos doentes apresentaram uma recuperação completa do compartimento de células B enquanto os outros dois retiveram os estados citopénico. Quanto aos doentes com manifestações de aGvHD de grau I e II, apresentaram um perfil de reconstituição do compartimento de células B comparável aos doentes livres da complicação quer na avaliação dos 6 meses, quer dos 12 meses (tabela 22).

Para todos os outros fatores avaliados não foram encontrados correlações estatisticamente significativas com a capacidade de reconstituição do compartimento linfóide B pelos doentes submetido a auto e aloTCE.

### **4.2.3. A Recuperação da Timopoiese e Reconstituição da Diversidade dos Repertórios Estruturais e Funcionais dos Clonotipos Celulares T**

#### **4.2.3.1. A Dinâmica da Timopoiese após o Transplante**

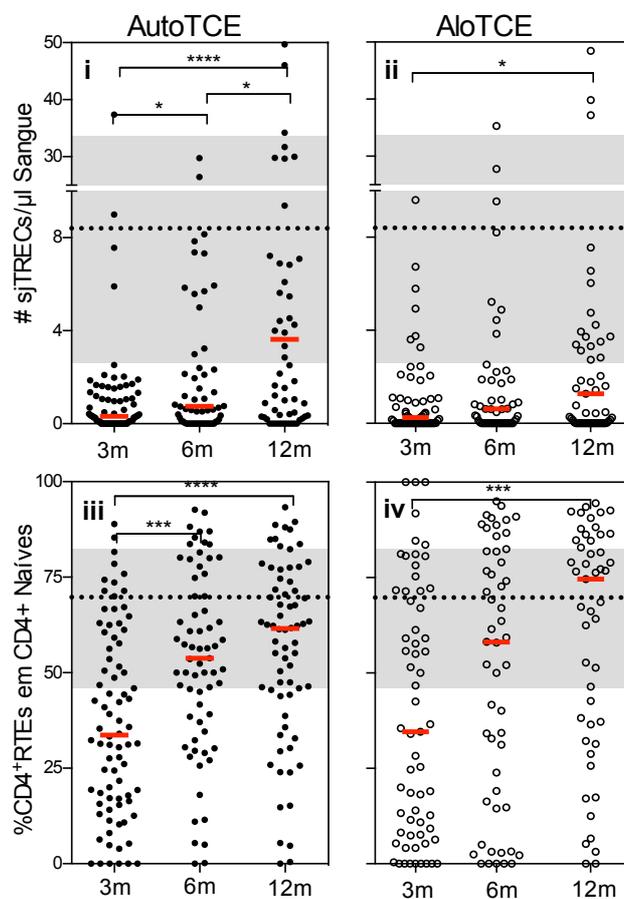
A timopoiese foi avaliada nas duas séries de doentes com a análise de dois fatores. O primeiro, constituiu uma análise quantitativa dos sjTRECs o que permite a identificação específica das células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  que fizeram o desenvolvimento tímico. O segundo, consiste na quantificação das células T  $CD4^+$  naïves circulantes emigrantes recentes do timo (RTEs) definidas pela expressão de CD31 [346], mais especificamente, neste estudo, estas células foram reconhecidas através do fenótipo  $CD4^+CD45RO^-CD31^+CD62L^+$ .

Para ambos os fatores, está bem estabelecida a dependência com a idade, devido à involução tímica. Há um decréscimo significativo da produção de células T naïves a partir do final da puberdade, que se acentua na idade adulta e ainda mais com a senescência da idade avançada [218]. Os intervalos de referência para as contagens no sangue periférico de sjTRECs e a frequência de RTEs, foram estabelecidos a partir de uma população controlo com uma distribuição de idades comparável às populações de doentes

Aos 3 meses de evolução, foram observadas contagens residuais de sjTRECs (0.32 (0.001-1.3) e 0.24 (0-1.1) sjTRECS/ $\mu$ l sangue, autoTCE e AloTCE, respetivamente; intervalo normal: 3.3-33.69 sjTRECS/ $\mu$ l) indicativa de uma atividade tímica muito comprometida. A população com enxerto autólogo apresentou um incremento significativo de células T com sjTREC entre pontos de análise e aos 12 meses de evolução a mediana apresentou-se no intervalo normal (3.6 (0.3-11.8)) (figura 27i).

Nos doentes com transplante alogénico a dinâmica da recuperação da atividade tímica é mais lenta. Aos 12 meses é observado um aumento das células contendo sjTREC

por comparação com o primeiro ponto de análise, no entanto, o valor mediano é inferior ao intervalo normal (1.3 (0-4.2) sjTRECs/ $\mu$ l) (figura 27i).



**Figura 27 – Análise da atividade tímica durante o primeiro ano após o transplante autólogo e alogénico de CEHs.**

Produção de células T contendo sjTRECs na população de doentes com enxerto autólogo (i) e alogénico (ii). Evolução da frequência de células recentemente emigradas do timo com o fenótipo  $CD4^+CD45RO^-CD31^+CD62L^+$ , no compartimento T  $CD4^+$  naïve, durante o primeiro ano após o transplante autólogo (iii) e alogénico (iv). São representados os valores individuais como pontos e a mediana da distribuição dos valores como a barra vermelha. As áreas sombreadas definem o intervalo normal na população controlo. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as contagens celulares entre tempos de análise e são indicadas as diferenças significativas. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ .

De seguida, foi analisada a evolução da frequência das células T  $CD4^+$  naïves recentemente emigradas do timo (CD4RTEs). A análise desta população celular apresenta dois significados: em primeiro lugar é um indicador da recuperação da timopoiese, em segundo lugar estas células são também a indicação da reconstituição da diversidade do repertório estrutural das células do compartimento T  $CD4^+$ . Nos indivíduos normais o compartimento T  $CD4^+$  naïve apresentou-se composto por cerca de 66% (46-82) (mediana, P10-P90) de células CD4RTEs. Ambos os grupos de doentes apresentaram uma evolução qualitativa do conteúdo de CD4RTEs relativamente semelhante. A frequência de CD4RTEs apresentou uma dispersão

elevada na primeira análise (autoTCE: 33.6% (16.6-59), aloTCE: 34.6% (7.6-71.4)). A partir do primeiro semestre, verificou-se uma tendência de normalização e aos 12 meses de evolução as duas populações de doentes apresentam proporções de médias CD4RTEs mais uniformes e em média nos limites normais (autoTCE: 61.5% (44-74.4), aloTCE: 74.6% (34.3-85.5)) (figuras 27iii e iv).

É importante salientar que a normalização observada do compartimento T CD4<sup>+</sup> naíve é somente qualitativa, na medida em que há um aumento progressivo da proporção de RTEs. A normalização quantitativa não é atingida durante a análise. Mesmo aos 12 meses de evolução, as contagens de CD4RTEs apresentaram-se muito inferiores aos limites normais (autoTCE: 14.4 (2.5-38.8), aloTCE: 13.1 (3.3-67.1) cél./ $\mu$ l; limites normais: 25.4-155.2 cél./ $\mu$ l).

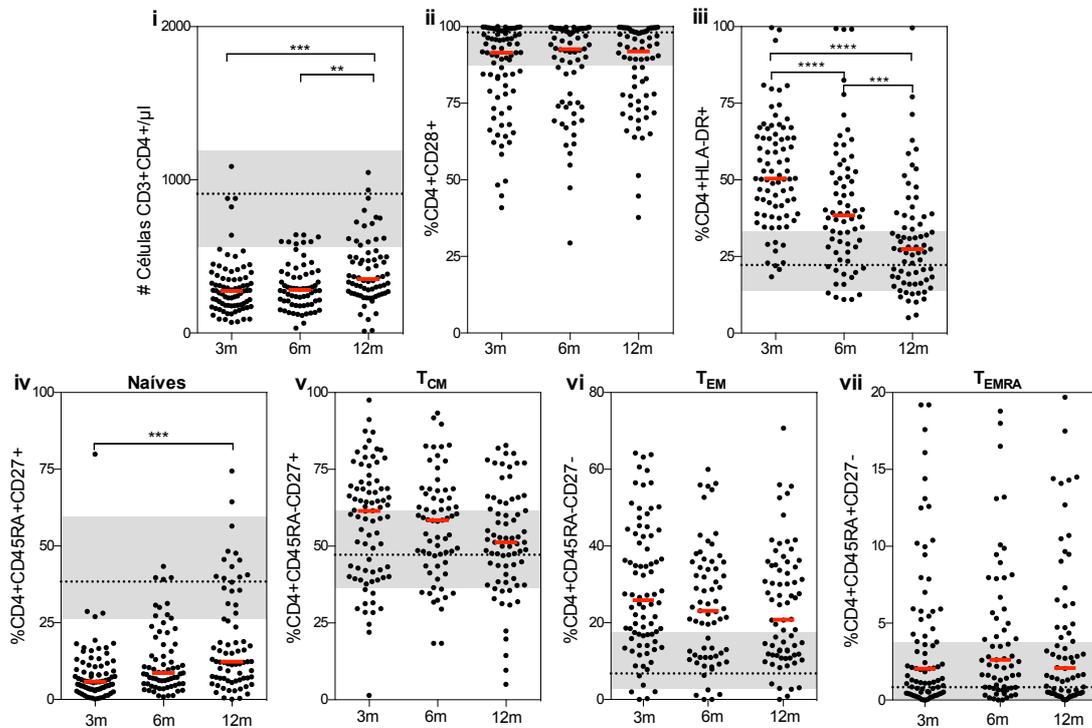
#### **4.2.3.2. Análise das Subpopulações Celulares T CD4<sup>+</sup> e da sua Diversidade Estrutural Durante a Evolução dos Transplantes Autólogos**

A série de doentes com enxerto autólogo apresentou um compartimento T CD4<sup>+</sup> linfopénico durante todo o período de análise. Foi observada uma tendência de recuperação a partir do segundo semestre de evolução (figura 28i), mas aos 12 meses de evolução todos os doentes apresentaram contagens celulares muito inferiores aos limites normais (351.8 (258.8-504.2) versus 563.5-1194 cél./ $\mu$ l) (mediana (IQR) na população de doentes e amplitude P10-P90 do controlo, respetivamente). O compartimento celular apresentou uma frequência normal da expressão CD28, uma molécula indicadora da competência para a ativação celular, sem variações significativas entre os pontos de análise (3m: 91.5% (78-98.6); 6m: 92.6% (75-99); 12m: 92% (76.9-98.3), intervalo normal: 87.4-99.9%) (figura 28ii). No entanto, foi observada uma frequência inicial muito aumentada de células T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, que diminuiu significativamente a partir dos seis meses de evolução, normalizando aos 12 meses (27.4% (17.4-38)) (figura 28iii).

A distribuição celular das várias subpopulações celulares maduras é marcada de forma determinante pela linfopenia da população de células naíves CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>. A contração desta população celular é muito severa, no ponto mais precoce da evolução há uma redução de -22x da contagem absoluta destas células e aos 12 meses a contração é de -7x em relação à contagem média de células nos indivíduos controlo (3m: 16.9 (7.6-28); 6m: 24.3 (12.2-50.5); 12m: 50.1 (18.1-93.7) versus intervalo normal: 193-619.8 cél./ $\mu$ l). A cinética de recuperação do compartimento naíve é lenta, somente aos 12 meses de evolução houve um aumento significativo da contagem absoluta destas células e, portanto, da sua frequência no compartimento celular T

CD4<sup>+</sup> (12m: 12.3% (6.9-30.1), intervalo normal: 26.3-59.6%) (figura 28iv).

A fração principal de células de memória CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> (memória central - T<sub>CM</sub>), apresentou à semelhança da naïve, uma contração durante o período de análise (3m:149.4 (91.8); 6m:145.2 (104.2-196.1); 12m:195.6 (131.3-242.5) versus intervalo normal: 258-568.7 cél./µl).



**Figura 28 – Dinâmica da diferenciação funcional e maturação do compartimento das células T CD4<sup>+</sup> durante os primeiros 12 meses após o transplante autólogo de CEHs.**

Os linfócitos do sangue periférico foram selecionados para a quantificação do compartimento total de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (i). O estado e a diferenciação destas células foram analisados estabelecendo a frequência, no compartimento total de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, das células competentes com expressão CD28 (ii), das células ativadas com expressão HLA-DR (iii) e a distribuição das células naïves e de memória definida através da expressão diferencial do CD45RA e do CD27. As células naïves foram classificadas com o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (iv), as células de memória central (T<sub>CM</sub>) com a expressão CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> (v), a população de memória efetora (T<sub>EM</sub>) com a expressão CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (vi) e as células de memória terminalmente diferenciadas (T<sub>EMRA</sub>) como as CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (vii). São representados os valores obtidos para cada indivíduo como pontos e a mediana destes valores como a barra vermelha. As áreas sombreadas definem o intervalo normal na população de controle. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as contagens e as proporções celulares entre tempos de análise e são indicadas as diferenças significativas. \*\*\*\*P<0.0001, \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01.

No entanto, esta não é tão severa, no ponto mais precoce da avaliação a redução é de -2.8x em relação à contagem média destas células no controle e aos 12 meses de -2x.

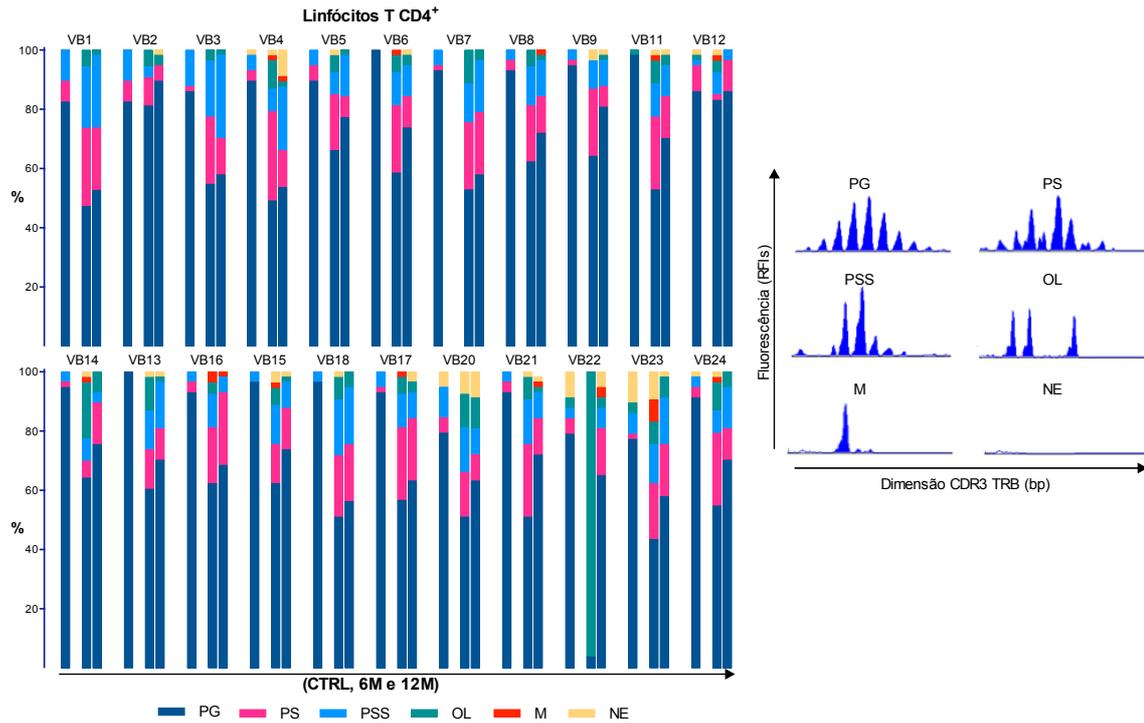
Em termos de distribuição, resulta que a frequência destas células no pool total de células T CD4<sup>+</sup> afigura-se normal (figura 28v).

Normalmente, a segunda fração de células de memória é a efetora CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (T<sub>EM</sub>). Esta população celular contagens absolutas normais e sem variações significativas ao longo do período de análise (3m: 57.9 (26.3-130), 6m: 68.1 (27.49-99.3), 12m: 74.4 (28.4-149.2) versus intervalo normal 19.25-183.4 cél./μl). No entanto, a sua proporção surge distorcida no compartimento total, com frequências sempre superiores aos limites normais (figura 28vi).

Foi observada uma evolução similar para a população minoritária de células de memória terminalmente diferenciadas CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (T<sub>EMRA</sub>). Os doentes transplantados apresentaram contagens absolutas destas células dentro dos valores normais em todos os pontos da análise (3m: 4.8 (1.2-13.9), 6m: 7.3 (1.8-17.7) e 12m: 8.1 (1.5-24.6) versus limite normal: 0.31-69.4 cél./μl). A proporção da população não sofre alterações significativas durante o tempo de análise e apresenta valores normais (figura 28vii).

De seguida, foi feita a análise da reconstituição da diversidade dos clonotipos T CD4<sup>+</sup>. A partir do cDNA destas células foram obtidos fragmentos contendo o domínio hipervariável CDR3 dos *TRVB*, o que representa a diversidade estrutural dos TCR expressos.

Verificou-se que a complexidade do repertório estrutural do TCR das células TCD4<sup>+</sup> apresentou diferenças significativas para todas as famílias TRVB quando comparado com os perfis de referência obtidos da população controlo (figura 29). No final do primeiro semestre de evolução, estes doentes apresentaram uma baixa frequência do perfil normal PG (56.6%±15.20 *versus* controlo:90.4%±6.8; média±SD), uma série de distorções relativamente bem vincadas (PSS: 11.4%±4.9; OL: 11.3%±19.3, M: 1.2%±1.9), assim como, um aumento da ausência famílias TRVB do repertório (NE:6.2%±8.0). Nos doentes avaliados aos 12 meses, observou-se uma tendência para o aumento da complexidade deste repertório, mas sem diferenças com significado estatístico para a avaliação anterior (PG: 68.5.7%±12.07, PS:13.7%±6.8, PSS: 12.7%±7.0, OL:3.3%±2.5 e M: 0.5%±1.0) (figura 29).



**Figura 29 – Repertório estrutural TRVB do compartimento T CD4<sup>+</sup> no pós-transplante autólogo.**

Os CDR3 TRB de cada família de segmentos TRVB1 a VB24, expressos como RNAm pelas células TCD4<sup>+</sup>, foram analisados por spectratyping de forma a estabelecer como frequências os perfis da diversidade e complexidade estrutural durante a recuperação do transplante autólogo. Os perfis foram classificados com base no número de picos, forma da distribuição dos picos e intensidade da fluorescência como policlonal gaussiano (PG), policlonal distorcida (PS), policlonal severamente distorcida (PSS), oligoclonal (OL), monoclonal (MO) e não expressa (NE) de acordo com a definição estabelecida na tabela 10 e conforme ilustrado na figura. As barras com as diferentes cores e cada coluna representam a frequência média de cada um dos perfis para cada família VB tal como definido na legenda. As primeiras colunas de cada família VB representam o perfil obtido para a população controlo, a segunda e terceira colunas representam a análise na população de doentes aos 6 e 12 meses após o transplante.

#### 4.2.3.3. Análise dos Repertórios Estruturais e Funcionais T CD8<sup>+</sup> Após o Transplante Autólogo

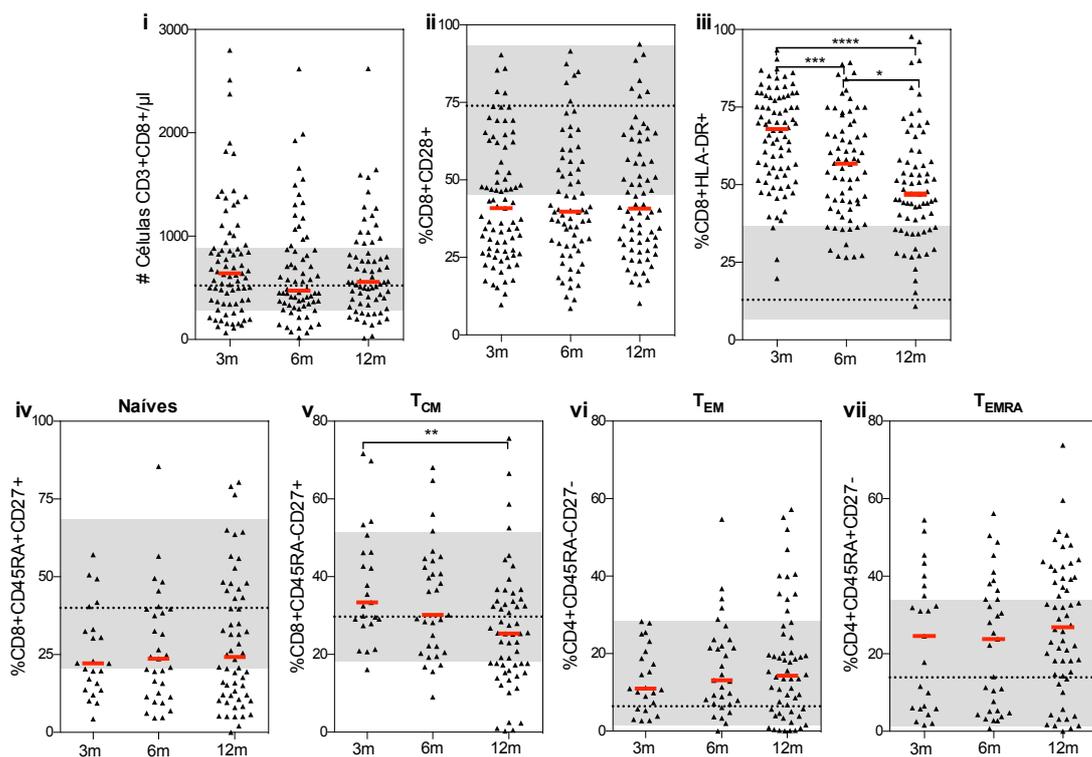
O compartimento T CD8<sup>+</sup> apresentou uma dinâmica evolutiva, muito diferente da observada no compartimento CD4<sup>+</sup>. Em primeiro lugar, desde os 3 meses, os doentes apresentaram contagens de células T CD8<sup>+</sup> nos limites normais e sem variações significativas na análise semestral e aos 12 meses (3m: 632.4 (342-922.2), 6m: 521 (378.8-963.2), 12m: 587.3 (357.9-964.6) *versus* limites normais: 340.6-1167 cél./µl) (figura 30i). As proporções das subpopulações maduras T CD8<sup>+</sup> naíves e de memória T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub> e T<sub>EMRA</sub> também não apresentaram alterações substanciais em relação aos valores normais, quer quantitativos quer qualitativos. De facto, foi observado que as proporções de células com os fenótipos característicos de cada uma destas

subpopulações apresentaram valores médios compreendidos no intervalo normal estabelecido a partir da população controlo (figuras 30iv a vii).

As principais diferenças neste compartimento foram observadas na distribuição de células que expressavam os marcadores de competência CD28 e de ativação HLA-DR.

A frequência de células T  $CD8^+CD28^+$  observada nos doentes foi inferior ao limite normal, sem diferenças significativas durante o período de análise (3m: 40.9% (27.0-60.6), 6m: 39.8% (29.0-56.0), 12m: 40.8% (29.1-59.4) versus limite normal: 45.3-93.44) (figura 30ii).

Os doentes aos 3 meses de evolução apresentam uma frequência de células  $CD8^+HLA-DR^+$  5,3x superior à frequência média do controlo (68% (53.3-78.2) versus 12.9% (6.6-36.7), respetivamente), com a evolução do transplante a proporção destas células desce significativamente no final do primeiro semestre e aos 12 meses apresentando, no entanto, uma frequência 3.8x superior ao normal (49.3% (32.6-62.6)) (figura 30iii).

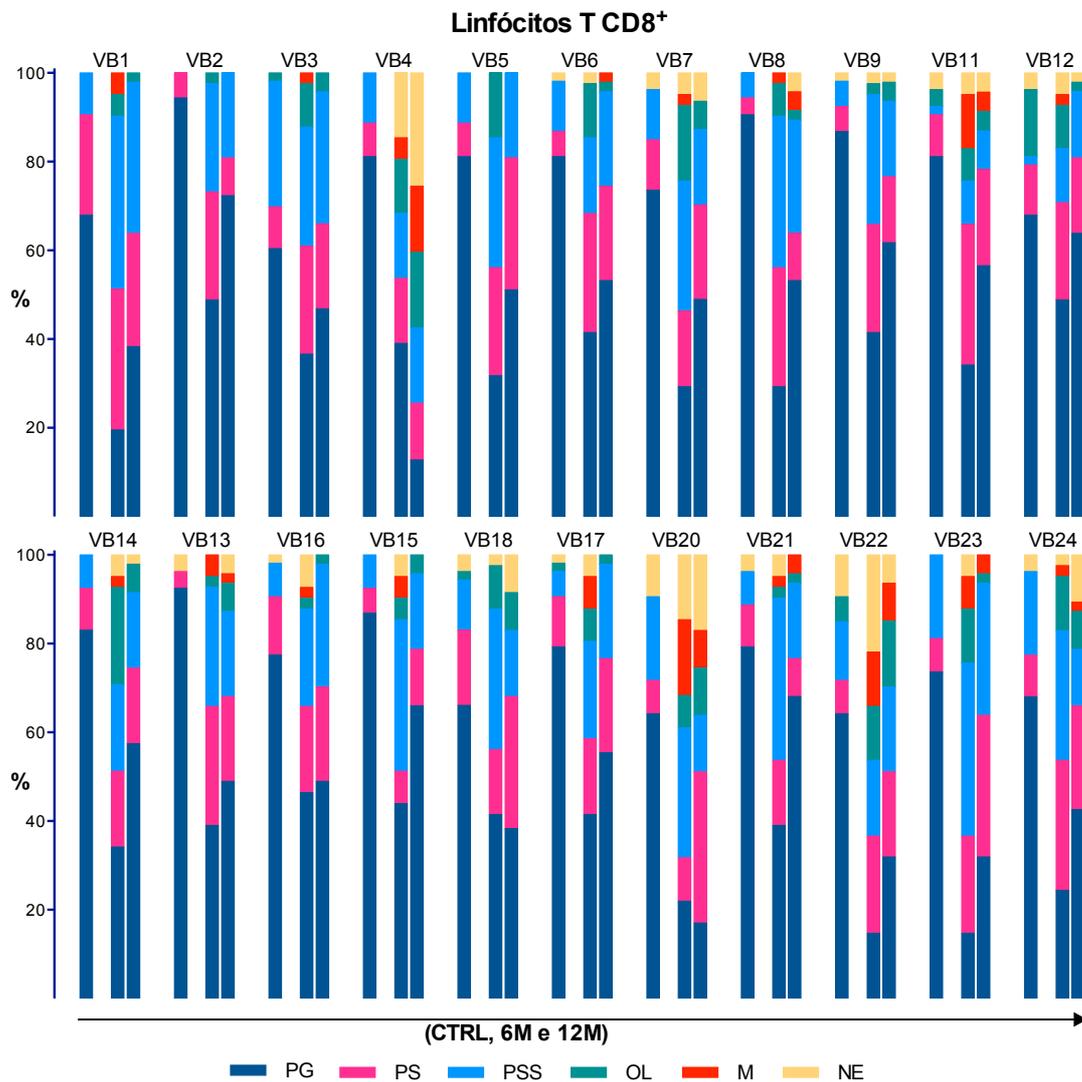


**Figura 30 – Análise da evolução das várias subpopulações do compartimento das células T  $CD8^+$  na população de doentes com transplante autólogo.**

O compartimento total de linfócitos T  $CD8^+$  foi quantificado (i) e analisado em relação à distribuição de células com expressão CD28 (ii), das células ativadas com expressão HLA-DR (iii), das células naíves com o fenótipo  $CD8^+CD45RA^+CD27^+$  (iv), das células de memória central ( $T_{CM}$ ) com a expressão  $CD8^+CD45RA^-CD27^+$  (v), das células de memória efetora ( $T_{EM}$ ) com a expressão  $CD8^+CD45RA^-CD27^-$  (vi) e das células de memória terminalmente diferenciadas como as  $CD8^+CD45RA^+CD27^-$  (vii). São representados os valores obtidos para

cada indivíduo como pontos e a mediana dos valores como a barra vermelha. As áreas sombreadas definem o intervalo normal na população controlo. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as contagens e as proporções celulares entre tempos de análise e são indicadas as diferenças significativas. \*\*\*\*P<0.0001, \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05.

Em relação ao repertório estrutural do TCR das células T CD8<sup>+</sup>, observou-se em primeiro lugar, que nos indivíduos controlo que há uma assimetria para a maioria das famílias de segmentos *TRVB*, ao contrário do que foi observado nas células T CD4<sup>+</sup> onde há uma predominância quase absoluta dos perfis policlonais com distribuição gaussiana (PG: 77.1%±9.8 versus 91.2%± 6.9, CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> respetivamente).



**Figura 31 – Evolução do repertório estrutural *TRVB* do compartimento T CD8<sup>+</sup> na população de doentes com transplante autólogo.**

Fragmentos específicos de família de segmentos *TRVB1* a *VB24* contendo o CDR3 foram produzidos a partir de cDNA de células T CD8<sup>+</sup>. Estes fragmentos foram analisados por *spectratyping* de forma a estabelecer complexidade estrutural do gene *TRB* que é expressa durante a recuperação imunológica após o transplante autólogo. Os perfis foram classificados com base no número de picos, forma da distribuição dos picos e intensidade da fluorescência como policlonal gaussiano (PG), policlonal distorcida (PS), policlonal severamente distorcida

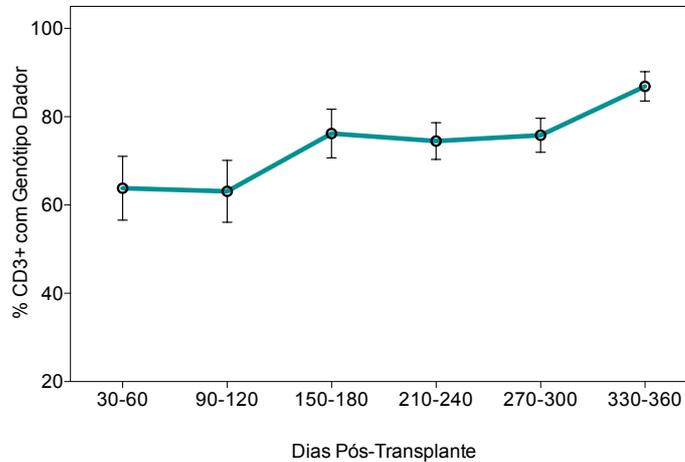
(PSS), oligoclonal (OL), monoclonal (MO) e não expressa (NE) de acordo com a definição estabelecida na tabela 10. As primeiras colunas de cada família VB representam o perfil obtido para a população controle, a segunda e terceira colunas representam a análise na população de doentes aos 6 e 12 meses após o transplante.

Isto significa, que a metodologia *spectratyping* do CDR3 do *TRB* deteta a presença de proliferações clonais das células T CD8<sup>+</sup> resultantes das respostas imunes nos indivíduos normais. Estas expansões celulares traduzem-se numa frequência relativamente elevada de perfis policlonais distorcidos (PS: 9.0%±4.5, PSS:9.6%±6.9) mesmo em indivíduos normais e saudáveis. Nos doentes, foi observado um quadro severamente distorcido do repertório *TRB* expresso pelas células T CD8<sup>+</sup>, no final do primeiro semestre de evolução dos transplantes (PG: 34.6%±10.1, PS:21.3%±6.6, PSS:26%±8.4, OL:8.7%±5.2, M:4.3%±4.5 e NE:4.9%±5.6). Com evolução da reconstituição imunológica e na análise aos 12 meses verifica-se uma tendência para o aumento da complexidade do repertório *TRB* (PG: 48.4%±15.4, PS:20%±7.2, PSS:19.6%±6.2, OL:5.1%±4.5, M:2.5%±3.9 e NE:4.3%±6.5). No entanto, tendo em conta as frequências relativamente elevadas dos perfis *TRB* severamente distorcidos, oligoclonais e monoclonais para além de famílias VB não expressas, verifica-se que a diversidade clonotípica do compartimento celular T CD8<sup>+</sup> ainda apresenta sérias limitações, o que poderá comprometer a competência imunológica destes doentes (figura 31).

#### **4.2.3.4. Evolução do Quimerismo Celular no Compartimento Linfóide T CD3<sup>+</sup> após o transplante alogénico de CEHs**

De acordo com as necessidades da avaliação clínica da função do enxerto, foi realizada uma análise seriada do quimerismo na população de células T CD3<sup>+</sup>, com determinação das proporções relativas de células com genótipo do dador em relação às células com genótipo autólogo. A frequência de doentes com quimerismo misto para a fração de células linfóides T é muito superior à observada para linhagens celulares mieloide e células NK. Nesta população de doentes, foi observado que entre os 90 e os 120 dias, seis (24%) dos doentes apresentavam quimerismo dador completo (%células do dador >95%), 17 (68%) doentes apresentavam quimerismo misto (%células do dador >5% e <95%) e 2 (8%) doentes apresentaram quimerismo inferior a 5% (estes doentes vieram a falecer e não foram estudados nos pontos de análise posteriores). Neste ponto de análise, a frequência média de células com genótipo do dador foi de 63%±35 (média±SD). Com a evolução dos transplantes, manteve-se a prevalência do quimerismo misto no compartimento linfóide T (figura 32). Numa primeira fase foi observada uma estabilização da frequência média de

células com genótipo do dador associado a um aumento significativo dos limites mínimos (150-180 dias:  $76\% \pm 28$ , 210-240 dias:  $75\% \pm 20$ , 270-300 dias:  $76\% \pm 17$ ). Na análise com cerca de 12 meses de evolução, a população de doentes, apresentou uma frequência média de células T do dador de  $86\% \pm 14$ .



#### Figura 32 – Evolução do quimerismo celular no compartimento linfóide T CD3<sup>+</sup>.

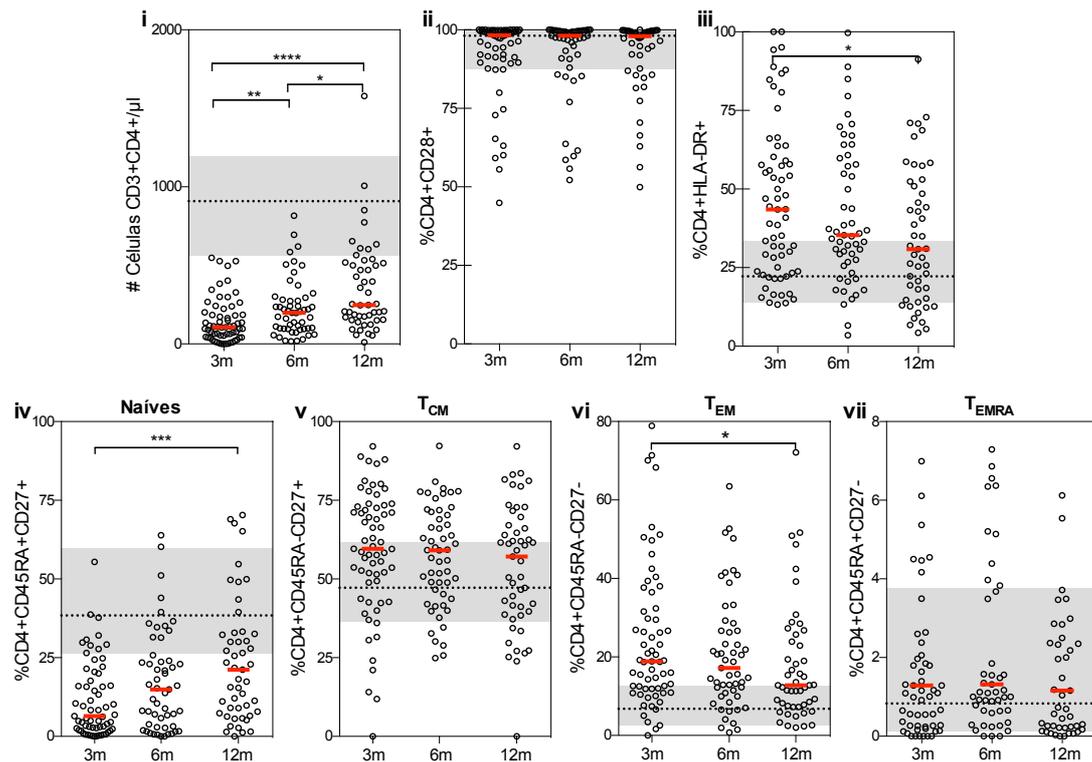
As células CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> foram separadas por *FACS cell-sorting* e foi quantificada a frequência relativa de células com o genótipo de dador relativamente ao genótipo autólogo. A curva representa a evolução da frequência de células T do dador que fizeram no sangue periférico da população de doentes em seis intervalos de tempo durante o primeiro ano de evolução. Os pontos representam a média  $\pm$  SEM da frequência de células T CD3<sup>+</sup> com genótipo do dador.

#### 4.2.3.5. Análise da Dimensão do Compartimento Celular T CD4<sup>+</sup>, Distribuição das Subpopulações Celulares e Diversidade do Repertório Estrutural Durante a Evolução dos Transplantes Alogénicos

A contração do compartimento T CD4<sup>+</sup> nos doentes com transplante alogénico é, à semelhança do que acontece na população de doentes com enxerto autólogo, muito severa e prolongada durante todo o período de análise (figura 32). A contagem média de células T CD4<sup>+</sup> na população de doentes com aloTCE foi aos 3 meses, 26x inferior à média do controlo e aos 12 meses permanece 11x inferior (3m: 106.9 (42.1-200.4), 6m: 247.6 (153-517), controlo: 2761 (563.5-1194) cél./ $\mu$ l sangue) (figura 33i). A expressão celular do CD28 apresentou-se normal e sem alterações significativas no período de análise (% células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> 3m: 98.3 (90.7-99.3), 6m: 98.1 (90.8-99.6), 12m (98 (87.35-99.6) versus limites do controlo: 87.4-99.9) (figura 33ii). A frequência de células CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> surgiu inicialmente aumentada, mas diminuiu progressivamente atingindo valores normais aos 12 meses de evolução (30.9% (15-51.6) versus limites normais: 14-33.3). (figura 33iii).

A população de células naïve CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, surgiu como a principal afetada pela

linfopenia induzida pelo condicionamento do transplante o que afetou as proporções de células maduras do compartimento T CD4<sup>+</sup> no pós-transplante. Aos 3 meses de evolução, a contagem absoluta destas células nestes doentes é 66x inferior à contagem obtida nos controlos (doentes 3 meses: 5.3 (0.93-23.7) *versus* controlo 354.2 (193-619.8) cél./ $\mu$ l). Aos 12 meses de evolução há um aumento significativo destas células (40.2 (12.4-134.7) cél./ $\mu$ l; P<0.0001) indicador de uma recuperação lenta.



**Figura 33 – Análise da diferenciação funcional e maturação do compartimento linfocitário T CD4<sup>+</sup> durante os primeiros 12 meses após o transplante alogénico**

As células T CD4<sup>+</sup> foram analisadas por citometria de fluxo selecionando com *gates* eletrónicos os linfócitos com marcação CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, para a quantificação no sangue periférico dos doentes aos 3,6 e 12 meses após a infusão do enxerto alogénico (i). A distribuição dos vários fenótipos celulares indicativos das maturação e estado funcional destas células foi feita estabelecendo a frequência, das células com expressão CD28 (ii), com expressão HLA-DR (iii) o fenótipo naïve CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (iv), de memória central (T<sub>CM</sub>) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> (v), de memória efetora (T<sub>EM</sub>) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (vi) e de memória terminalmente diferenciada (T<sub>EMRA</sub>) como as CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (vii). São representados os valores obtidos para cada indivíduo como pontos e a mediana da distribuição destes valores como a barra vermelha. As áreas sombreadas definem o intervalo normal na população controlo. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as contagens e as proporções celulares entre tempos de análise e são indicadas as diferenças significativas. \*\*\*\*P<0.0001, \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05.

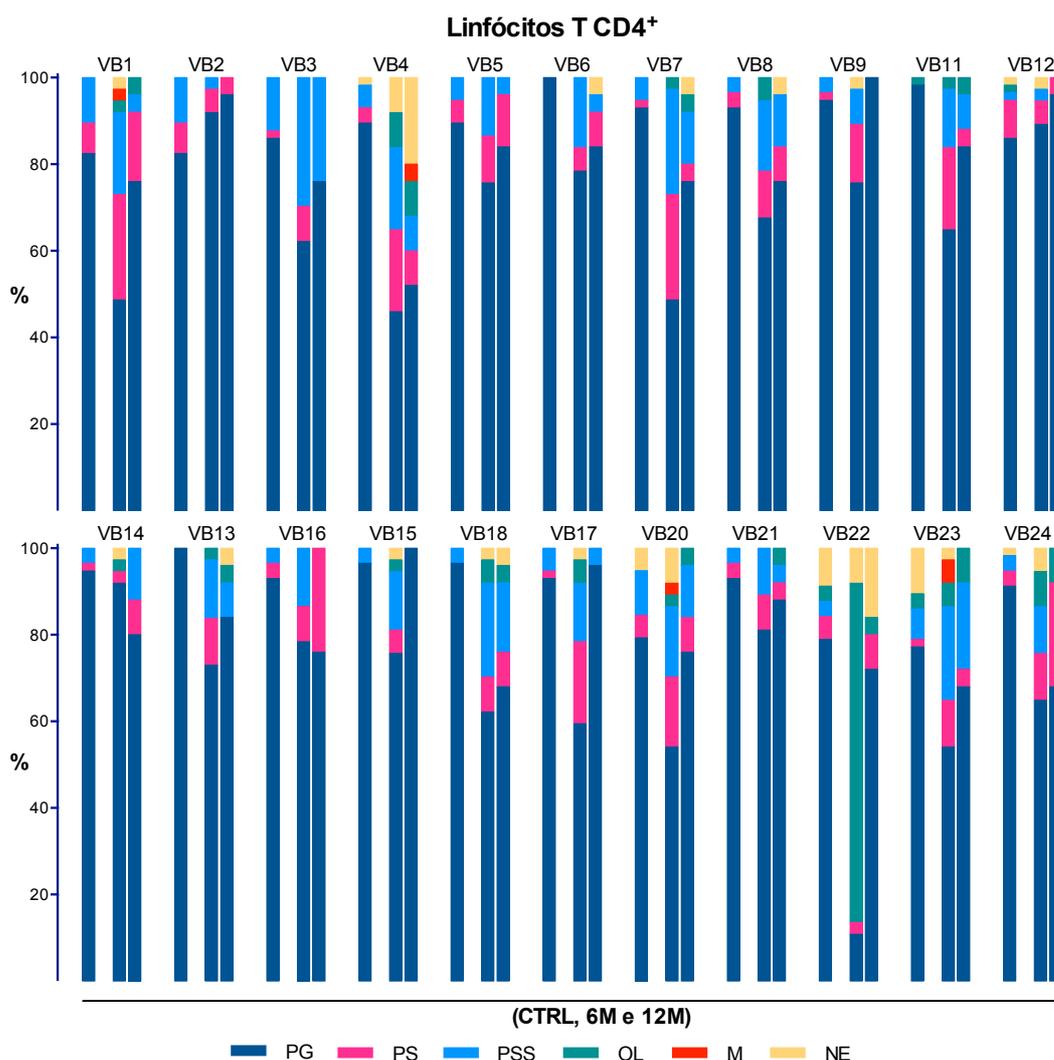
Aos 12 meses a população de células T CD4<sup>+</sup> naïves é cerca de 8.8x inferior ao normal e representa 21% (7.6-32.7) do compartimento total T CD4<sup>+</sup>, um valor abaixo do limite normal (23.3-59.6 cél./ $\mu$ l) (figura 33iv).

Em relação às frações de memória, a única que surge citopénico é a de memória central  $T_{CM}$  com o fenótipo  $CD4^+CD45RA^-CD27^+$ , que apresentou no ponto inicial da análise uma contagem 6.6x inferior ao normal (63.2 (24.48-121.4); versus controlo, 418.3 (258-568.7) cél./ $\mu$ l), melhorou aos 12 meses mas mantém-se inferior aos níveis normais (103.6 (61.3-157.6) cél./ $\mu$ l). A contração deste compartimento não é, no entanto, visível quando é analisada a frequências destas células no compartimento total (figura 33v).

A fração de células de memória efetora ( $T_{EM}$ ) com o fenótipo  $CD4^+CD45RA^-CD27^-$  surgiu, aos 3 meses, com uma contagem absoluta perto do limite mínimo normal (18.3 (6.5-42.16) versus limite normais: 19.25-183.4 cél./ $\mu$ l) e a partir dos seis meses de evolução apresentou contagens normais (6m: 21.6 (11.4-62.5), 12m: 31.8 (15.6-71.7) cél./ $\mu$ l). No contexto das alterações da distribuição de células no compartimento  $T_{CD4^+}$ , esta subpopulação em particular, surgiu com uma frequência relativa elevada no ponto de análise mais precoce que veio a normalizar à medida da recuperação das populações celulares naíves e  $T_{CM}$  (figura 33vi).

A população de memória terminalmente diferenciada ( $T_{EMRA}$ )  $CD4^+CD45RA^+CD27^-$  é uma população minoritária cujas contagens absolutas em indivíduos normais apresentam um intervalo relativamente largo (0.3-69 células/ $\mu$ l). Durante a reconstituição do compartimento  $T_{CD4^+}$  estas células apresentam contagens e frequências relativas comparáveis aos limites normais (figura 32vii).

A heterogeneidade do repertório estrutural *TRB* destes doentes foi analisada verificando os perfis da distribuição de tamanhos dos fragmentos CDR3 do gene *TRB* (figura 34).



**Figura 34 – Diversidade do repertório estrutural *TRVB* durante a reconstituição do compartimento T CD4<sup>+</sup> após o transplante alogénico de CEHs.**

As barras empilhadas de cada coluna representam a frequência média de cada perfil de complexidade das várias famílias de segmentos TRVB1 a VB24. Estes perfis foram estabelecidos a partir de electroferogramas dos CDR3 TRB classificados em relação ao número de fragmento e à distribuição e intensidade dos respetivos picos. Os perfis foram classificados como policlonal gaussiano (PG), policlonal distorcida (PS), policlonal severamente distorcida (PSS), oligoclonal (OL), monoclonal (MO) e não expressa (NE) tal como definido na tabela 10. As primeiras colunas de cada família VB representam o perfil obtido para a população controlo, a segunda e terceira colunas representam a análise na população de doentes aos 6 e 12 meses após o transplante.

Foi observada uma restrição significativa do repertório TCRBV dos doentes quando comparados com vários os perfis obtidos na população de indivíduos controlo (figura 34). Aos seis meses de evolução verificou-se que os doentes apresentaram uma diminuição significativa do perfil que representa a maior complexidade o PG e um aumento dos perfis policlonais com distorções significativas (PG: 66%±18.5, PS: 11.3%±6.4, PSS:13.6%±7.7 versus controlo PG: 91%±6.9, PS: 2.7%±2.4, PSS:

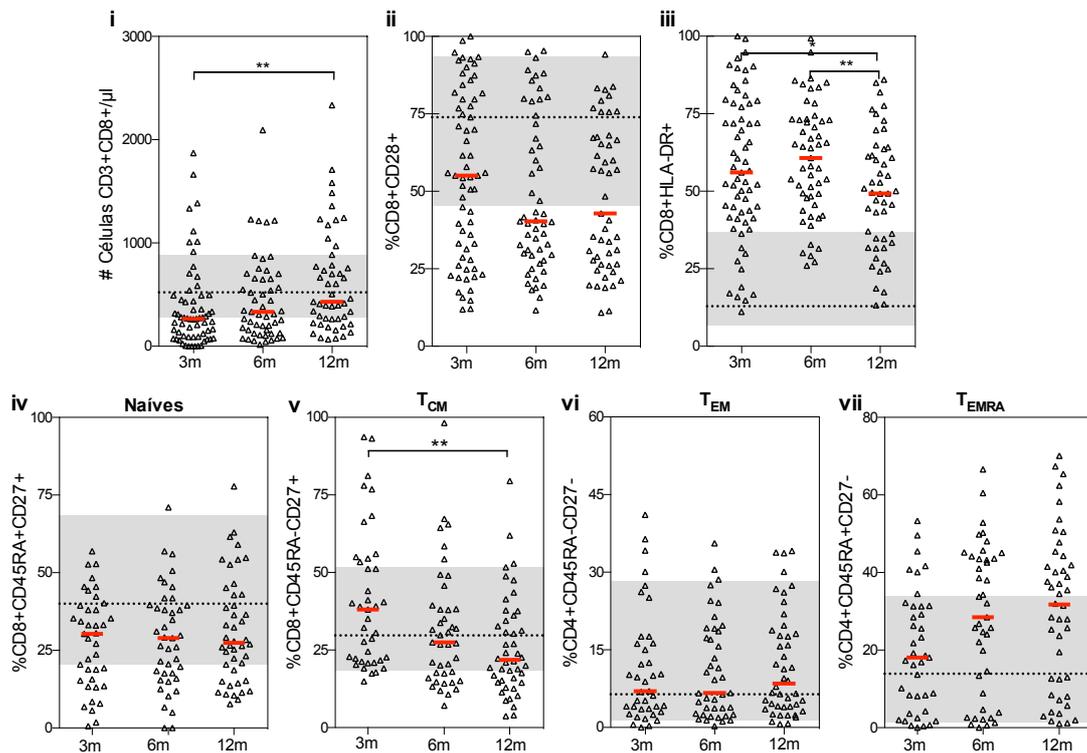
4.3%±3.3). Algumas famílias de genes *TRVB*, em particular a VB1, VB4, VB8, VB22, VB23 e VB24 apresentaram perfis oligoclonais e monoclonais indicativos da dominância de alguns clones de células T CD4<sup>+</sup>. Há uma tendência significativa para a recuperação de um repertório com a diversidade normal, com evolução dos transplantes, e aos 12 meses, o repertório apresenta uma complexidade com o seguinte perfil: (PG: 80.7%±12.1, PS:7.1%±6.8, PSS:6.9%±7.0, OL:2.5%±2.9, M:0.2%±0.8 e NE:2.5%±5.3).

#### **4.2.3.6. Análise da Diversidade, Maturação e Diferenciação Funcional das Células T CD8<sup>+</sup> Após o Transplante Alogénico**

No primeiro ponto de análise, aos 3 meses após transplante, a população de doentes com enxerto alogénico apresentou uma contagem de células T CD8<sup>+</sup> um pouco inferior aos limites normais (264.9 (90.8-491.4) *versus* limites controlo: 283.2-884.0 células/ $\mu$ l). Foi observada, para a maior parte dos doentes, uma recuperação progressiva do compartimento T CD8<sup>+</sup> que aos 12 meses apresentou uma dimensão média normal (430.6 (245.1-835.1) células/ $\mu$ l) (figura 35i).

A caracterização fenotípica destas células revelou uma grande heterogeneidade entre doentes. A análise da expressão de CD28 e HLA-DR pelas células T CD4<sup>+</sup> revelou uma grande variabilidade inicial observando-se uma dispersão continua na frequência destas células na população de doentes. Com a evolução dos transplantes foi observada uma tendência para uma contração da população de células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, mas aos 12 meses após o transplante, cerca de 50% dos doentes apresentava uma frequência normal destas células enquanto a outra metade apresentava valores inferiores aos limites normais (figura 35ii).

Em relação à distribuição de células T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, foi observado um aumento transitório da frequência destas células, que diminuiu aos 12 meses, mas que ainda se apresentou superior aos limites normais (49.3% (32.6-62.6) *versus* limites normais 6.5-36.7%) (figura 35iii).

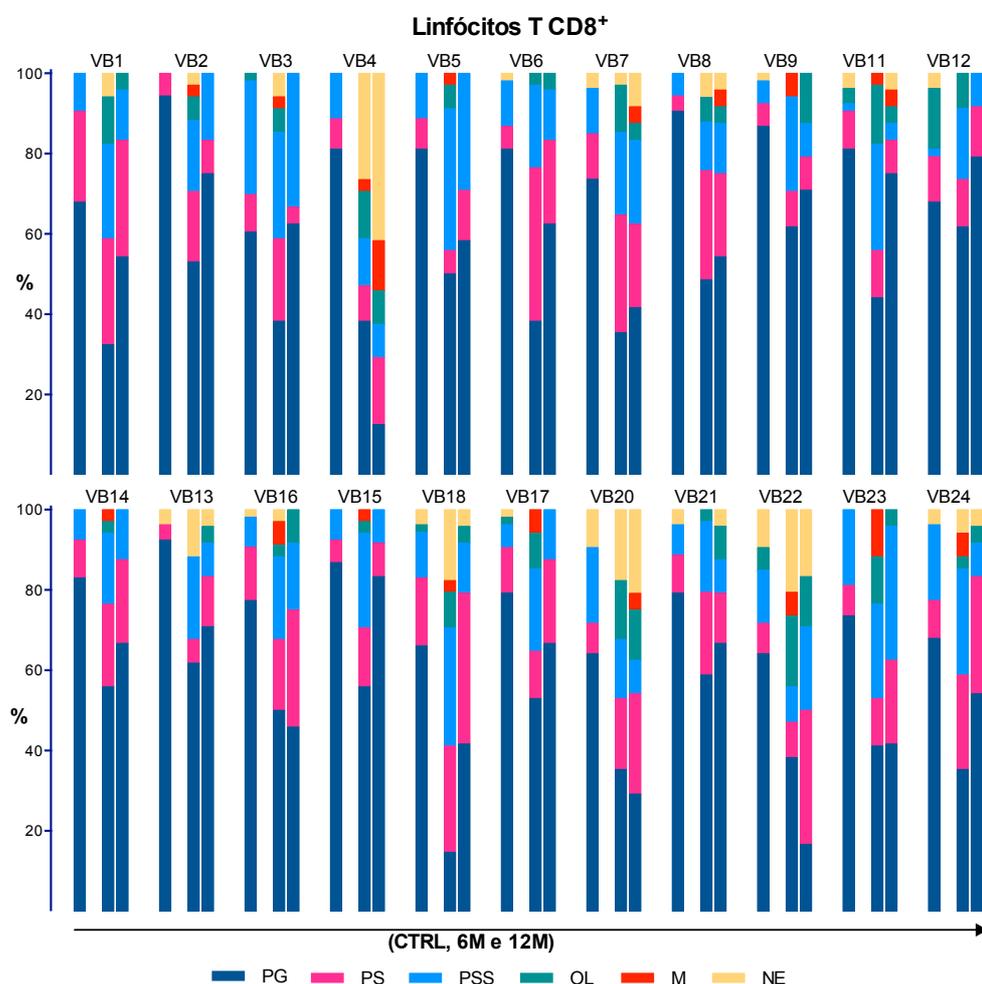


**Figura 35 – Análise qualitativa do compartimento celular T CD8<sup>+</sup> nos doentes em recuperação de um transplante alogénico de CEHs**

O compartimento total de células T CD8<sup>+</sup> foi quantificado por citometria de fluxo como os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (i) e analisado em relação à distribuição de células com expressão CD28 (ii), das células ativadas com expressão HLA-DR (iii), das células naíves com o fenótipo CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (iv), das células de memória central (T<sub>CM</sub>) com a expressão CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> (v), das células de memória efetora (T<sub>EM</sub>) com a expressão CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (vi) e das células de memória terminalmente diferenciadas como as CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (vii). São representados os valores obtidos para cada indivíduo como pontos e a mediana dos valores na população como a barra vermelha. As áreas sombreadas definem o intervalo normal na população controle. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as contagens e as proporções celulares entre tempos de análise e são indicadas as diferenças significativas. \*\*P<0.01, \*P<0.05.

Em relação às subpopulações naíves e de memória, em termos quantitativos, os doentes apresentam numa primeira fase uma pequena contração das naíves e de memória central. Com a evolução, houve um aumento muito progressivo das contagens destas células e aos 12 meses, ambas as populações celulares apresentaram contagens absolutas um pouco superiores ao limite inferior normal (naíves: 123.8 (76.8-256.9) *versus* limite normal: 106.8-457.4, T<sub>CM</sub>: 167.8 (79.4-221.9) *versus* limite normal: 63.7-376.5). A dimensão da fração celular de memória a efetora CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (T<sub>EM</sub>) não sofreu alterações significativas e permaneceu nos limites obtidos para a população controle deste estudo. Já a população efetora terminalmente diferenciada CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (T<sub>EMRA</sub>), apresentou um aumento significativo nas contagens absolutas a partir dos 6 meses de evolução. A distribuição de células por estes 4 compartimentos não apresenta, no entanto, muitas diferenças

significativas e a frequência de cada fração celular aos 12 meses de evolução apresenta-se dentro dos limites estabelecidos a partir da população controlo (figura 35iv a vii).



**Figura 36 – Diversidade estrutural do repertório *TRVB* do compartimento T CD8<sup>+</sup> na população de doentes com transplante alogénico.**

Fragmentos específicos de família de segmentos *TRVB*1 a *VB*24 contendo o CDR3 foram produzidos a partir de cDNA de células T CD8<sup>+</sup>. Estes fragmentos foram analisados por *spectratyping* de forma a estabelecer complexidade estrutural do gene *TRB* que é expressa durante a recuperação imunológica após o transplante autólogo. Os perfis foram classificados com base no número de picos, forma da distribuição dos picos e intensidade da fluorescência como policlonal gaussiano (PG), policlonal distorcida (PS), policlonal severamente distorcida (PSS), oligoclonal (OL), monoclonal (MO) e não expressa (NE) de acordo com a definição estabelecida na tabela 10. As primeiras colunas de cada família *VB* representam o perfil obtido para a população controlo, a segunda e terceira colunas representam a análise na população de doentes aos 6 e 12 meses após o transplante.

O repertório TCR expresso pelas células T CD8<sup>+</sup> destes doentes apresentou alterações muito pronunciadas indicadoras de uma diversidade clonotípica limitada. Verificou-se em vários doentes, primeiro uma distorção generalizada da diversidade estrutural do gene *TRB* e segundo a ausência completa no repertório, de famílias de segmentos genéticos como o *TRVB*4, *TRVB*13, *TRVB*18, *TRVB*20 e *TRVB*22 (figura

36). A ausência no repertório de famílias de segmentos *TRVB* é na maior parte dos casos, observada na análise aos 6 e também aos 12 meses. Verificou-se ainda que são relativamente frequentes os perfis oligoclonais e monoclonais compatíveis com a presença de proliferações celulares (6 meses, OL: 7.4%±5.0, M: 2.9%±3.0; 12 meses, OL: 4.5%±4.3, M:1.3%±2.3 *versus* controlo, OL:1.4%±3.4 e M: 0%).

#### **4.2.3.7. Fatores Pré e Pós-Transplante com Impacto na Recuperação Quantitativa das Subpopulações Linfocitárias T após o Transplante Autólogo de CEHs**

Foi verificada a relação entre as diferenças clínicas e demográficas dos doentes com enxerto autólogo e a capacidade de recuperação quantitativa das várias subpopulações naíves e de memória dos compartimentos linfocitários T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Para esta análise, os doentes com 12 meses de evolução foram agrupados variáveis categóricas comuns, e foi comparada as proporções de doentes com contagens absolutas de células superiores e inferiores ao percentil 75 (P75%) da distribuição, na população total de doentes.

A idade dos doentes transplantados é um fator com um impacto decisivo na cinética e capacidade de recuperação dos compartimentos celulares T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em particular, os diretamente relacionados à atividade tímica. Como é apresentado na tabela 23, a proporção de doentes pediátricos (com idade <18 anos) que apresentam uma contagem de células T CD4<sup>+</sup> recentemente emigradas do timo (RTEs) e também de células T CD4<sup>+</sup> com o fenótipo naíve CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> superior ao P75 é significativamente superior quando comparada com os doentes adultos (idade entre 19 e 55 anos) e muito superior e muito superior no grupo de doentes com mais de 55 anos (T CD4<sup>+</sup> RTEs: 80% versus 31%, P=0.01 e 80% versus 6.7% P<0.0001; T CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>: 80% versus 28%, P=0.007 e 80% versus 6%, P<0.0001) (<18 versus 19-55 anos e <18 anos versus >55 anos, respetivamente). Mais, quando comparadas os grupos de doentes com 19-55 anos e >55 anos, o primeiro grupo apresenta também contagens de células T CD4<sup>+</sup> naíves superiores ao segundo (RTEs: 31% versus 6.7%, P=0.02; T CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>: 28% versus 6%, P=0.04).

**Tabela 23 – Análise do impacto dos fatores clínicos e de fatores do pós-transplante na recuperação das populações celulares T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após o transplante autólogo.**

Fatores	N	CD45RO <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> (RTEs)		CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (Naíves)		CD45RA <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> (T <sub>CM</sub> )		CD45RA <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> (T <sub>EM</sub> )		CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> (T <sub>EMRA</sub> )	
		n (%)	P OR (95%CI)	n (%)	P OR (95%CI)	n (%)	P OR (95%CI)	n (%)	P OR (95%CI)	n (%)	P OR (95%CI)
<b>Compartimento Linfocitário T CD4<sup>+</sup></b>											
<b>Idade</b>											
≤18	10	8 (80)		8 (80)		2 (20)	ns	1 (10)	ns	1 (10)	ns
19-55	29	9 (31)	0.01 9 (1.6-51)	8 (28)	0.007 11 (1.8-60)	9 (31)	ns	8 (28)		5 (17)	ns
>55	30	2 (6.7)	<0.0001 <sup>§</sup> 56 (6.8-463) <sup>§</sup> 0.02 <sup>§§</sup> 6.3 (1-32) <sup>§§</sup>	2 (6)	<0.0001 <sup>§</sup> 56 (6.8-463) <sup>§</sup> 0.04 <sup>§§</sup> 5.3 (1-28) <sup>§§</sup>	7 (23)	ns <sup>§</sup> ns <sup>§§</sup>	11 (37)	ns <sup>§</sup> ns <sup>§§</sup>	8 (27)	ns <sup>§</sup> ns <sup>§§</sup>
<b>RTEs*</b>											
6m <P25	14			1 (7.4)	0.02	5 (36)	ns	4 (29)	ns	2 (14)	ns
6m >P50	30			13 (43)	0.1 (0.012-0.87)	7 (23)		6 (20)		8 (27)	
<b>sjTRECs**</b>											
6m <P25	45	6 (13)	0.0002	6 (13)	0.0002	11 (24)	ns	14 (31)	ns	12 (27)	ns
6m >P50	11	8 (73)	0.06 (0.012-0.28)	8 (73)	0.06(0.012-0.28)	3 (27)		0 (0)		1 (9.1)	
<b>Compartimento Linfocitário T CD8<sup>+</sup></b>											
<b>Idade</b>											
≤18	7			5 (71)		0 (0)	ns	0 (0)	ns	0 (0)	ns
19-55	22			4 (18)	0.02 11 (1.6-80)						

>55	24	4 (16)	0.01 <sup>\$</sup> 13 (1.8-89) <sup>\$\$</sup> ns	11 (46)	ns	9 (37.5)	ns	6 (25)	ns
<b>Doença Primária</b>									
Linfoma	23	5 (22)	ns	8 (35)	ns	9 (39)	ns	11 (48)	0.004
Mieloma	30	8 (27)		6 (20)		5 (17)		3 (10)	8.3 (1.9-35)
<b>Infeções</b>									
Vírus +	9	3 (23)	ns	2 (20)	ns	0 (0)	ns	5 (56)	0.04
Vírus -	44	10 (25)		12 (27)		9 (37.5)		9 (20)	4.9 (1.1-22)
<b>sjTRECs</b>									
6m <P25	31	6 (19)	ns	11 (35)	ns	11 (35)	ns	9 (29)	ns
6m >P50	10	4 (40)		2 (20)		1 (10)		1 (10)	

N, número total de doentes agrupados por cada fator de análise; n, número de doentes com contagens absolutas de cada subpopulação celular T superior ao segundo quartil (P75%) da distribuição total na população de doentes estudada aos 12 meses de evolução; % frequência desta proporção de doentes; OR (95%CI), odds Ratio e intervalo de confiança 95%.

<sup>\$</sup> doentes ≤18 anos *versus* >55 anos

<sup>\$\$</sup> doentes 19-55 anos *versus* >55 anos

\* Doentes agrupados com base nas contagens células T CD4+ recentemente emigradas do timo <P10% e >P50% da distribuição ordenada de valores aos 6 meses de evolução dos transplantes.

\*\* Doentes agrupados com base nas contagens de sjTRECs (<P25% e >P50%) estabelecidos a partir da distribuição total em cada população de doentes) aos 12 meses pós-transplante.

No compartimento T CD8<sup>+</sup> foi analisada somente a população naíve com expressão CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, tendo sido observado que a recuperação quantitativa destas células foi superior nos doentes pediátricos (71% versus 18%, P=0.02; 71% versus 16%, P=0.01) (<18 versus 19-55 anos e <18 anos versus >55 anos, respectivamente). Não foram, no entanto, observadas diferenças significativas, entre os grupos de doentes com idade adulta (18% versus 16%, P não significativa).

A análise dos níveis de sjTRECS aos seis meses de evolução é fortemente correlacionada com os níveis de células naíves quantificados aos 12 meses de evolução. A correlação obtida é semelhante quer para as células T CD4<sup>+</sup> RTEs quer para as naíves CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>. Os doentes com níveis de sjTRECS aos 6 meses de idade acima do percentil 50 da distribuição na população de doentes, apresentam aos 12 meses contagens de ambas estas populações de células superiores, quando comparados com um grupo de doentes com níveis anteriores de sjTRECS inferiores ao P25 (proporções: 73% versus 13%, P=0.0002). Uma correlação semelhante foi observada em relação às células CD4<sup>+</sup> RTEs, os doentes com níveis superiores destas células aos 6 meses apresentam o maior compartimento naíve total aos 12 meses de evolução (tabela 23).

A correlação significativa entre os níveis anteriores de sjTRECS e a dimensão da população celular naíve foi só observada no compartimento T CD4<sup>+</sup>. No compartimento T CD8<sup>+</sup> foi apontada uma tendência no mesmo sentido, mas que não atinge significado estatístico (40% versus 19%, P não significativa) (proporção de doentes com níveis de sjTRECS aos 6 meses >P50 e contagens de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> aos 12 meses >P75 versus proporção de doentes com níveis de sjTRECS aos 6 meses <P25 e contagens de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> aos 12 meses >P75).

A recuperação quantitativa das populações de células de memória central, memória efetora e memória terminalmente diferenciada do compartimento T CD4<sup>+</sup> não apresenta correlações significativas com os vários fatores clínicos analisados. Foi, no entanto, notada, uma tendência nos doentes com idade mais avançada para exibir uma maior dimensão das subpopulações de memória efetora e terminalmente diferenciada (tabela 23).

Em relação ao compartimento T CD8<sup>+</sup>, a dimensão aos 12 meses de evolução, das populações de memória central e memória efetora, também não apresenta correlações significativas com os fatores clínicos avaliados. Foram observadas algumas correlações significativas em relação à população de células de memória minoritária efetora terminalmente diferenciada T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>. Os doentes com linfoma apresentam contagens absolutas desta população celular superiores,

quando comparados com os doentes com mieloma (48% versus 10%,  $P=0.004$ ). Da mesma forma, os doentes que sofreram infeções virais após o transplante apresentaram uma maior dimensão deste mesmo compartimento (56% versus 20%), mas uma tendência para um compartimento de memória efetor T  $CD8^+CD45RA^-CD27^-$  mais restrito (0 doentes com contagem destas células superior ao P75 da distribuição na população versus 37,5% nos doentes sem infeções virais,  $P$  não significativa).

#### **4.2.3.8. Análise do Impacto dos Vários Fatores Clínicos na Reconstituição dos Repertórios Linfocitários T pelos Doentes com Transplante Alogénico**

Uma análise semelhante à anteriormente descrita foi elaborada para a população de doentes com enxerto alogénico. Os doentes foram agrupados de acordo com as características clínicas identificadas na tabela 5 e em relação aos níveis dos indicadores da atividade tímica aos 6 meses de evolução (contagens de sjTREC<sub>s</sub> e células  $CD4^+$  RTEs). Em cada grupo, foram contabilizados os doentes que apresentaram a maior recuperação quantitativa de cada uma das subpopulações celulares naïves e de memória, de ambos os compartimentos linfocitários  $CD4^+$  e  $CD8^+$  (ponto de análise colocado como o percentil 75 da distribuição ordenada de cada população celular quantificada na população de doentes aos 12 meses de evolução dos transplantes).

Os resultados mais importantes desta análise são apresentados na tabela 24. Tal como na população com transplante autólogo, a idade dos doentes revelou-se um fator fundamental para a demonstração da capacidade de recuperação rápida das células naïves. Os doentes com idade inferior a 18 anos, logo com maior atividade tímica, apresentaram uma maior dimensão das populações de células  $CD4^+$  RTEs e também do *pool* total naïves  $CD4^+CD45RA^+CD27^+$ , quando comparados com o grupo de doentes de idade adulta e com idade superior a 55 anos ( $CD4^+$  RTEs: 53% versus 8%,  $P=0.0003$  e 53% versus 0%  $P<0.02$ ;  $CD4^+CD45RA^+CD27^+$ : 53% versus 4%,  $P=0.0004$  e 53% versus 0%,  $P<0.02$ ) ( proporções de doentes com contagens celulares  $>P75$ ,  $<18$  versus 19-55 anos e  $<18$  anos versus  $>55$  anos, respetivamente).

Tabela 24 – Análise de vários fatores clínicos pré e pós-transplante na recuperação das populações celulares T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após o transplante alogênico.

Fatores	N	CD45RO <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> (RTEs)		CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (Naíves)		CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (T <sub>CM</sub> )		CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> (T <sub>EM</sub> )		CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> (T <sub>EMRA</sub> )	
		# (%)	P OR (95%CI)	# (%)	P OR (95%CI)	# (%)	P OR (95%CI)	# (%)	P OR (95%CI)	# (%)	P OR (95%CI)
<b>Compartimento Linfocitário T CD4<sup>+</sup></b>											
<b>Idade</b>											
≤18	1 7	9 (53)		9 (53)		7 (41)		4 (23)		4 (23)	
19-55	2 5	2 (8)	0.003 13 (2.3-73)	1 (4)	0.0004 27 (2.9-248)	4 (16)	ns	2 (8)	ns	3 (12)	ns
>55	7	0 (0)	0.02 35 (0.83-340)	0 (0)	0.02 35 (0.83-340)	1 (14)	ns	4 (57)	ns	3 (43)	ns
<b>Infeções</b>											
Bactérias -	2	4 (17)	ns	2 (9)	ns	5 (22)	ns	6 (26)	ns	8 (35)	0.03
Bactérias +	2 6	7 (27)		8 (31)		7 (27)		4 (15)		2 (8)	6.4 (1.2-34)
<b>RTEs</b>											
6m <P25	1			0 (0)	0.006	2 (17)	ns	2 (17)	ns	2 (17)	ns
6m >P50	2 4			11 (46)	0.05 (0.002-0.9)	9 (37)		6 (25)		6 (25)	
<b>sjTRECs</b>											
6m <P25	1	1 (10)	ns	1 (10)	ns	2 (20)	ns	1 (10)	ns	1 (10)	ns
6m >P50	2 6	6 (23)		7 (27)		7 (27)		6 (23)		7 (26)	
<b>Compartimento Linfocitário T CD8<sup>+</sup></b>											
<b>Idade</b>											
≤18	1			6 (43)	ns	4 (29)	ns	3 (21)	ns	5 (36)	ns
>18	3			5 (17)		7 (23)		8 (27)		6 (20)	

**Profilaxia GVHD**

CsA+MTX	1	4 (23)	ns	1 (6)	0.03	2 (12)	ns	1 (6)	0.03
FK506+MTX	2	7 (25)		10 (37)	0.1 (0.01-0.9)	9 (33)		10 (37)	0.1 (0.01-0.9)

**sjTRECc**

6m <P25	1	2 (20)	ns	4 (40)	ns	3 (30)	ns	3 (30)	ns
6m >P50	2	6 (27)		5 (23)		5 (23)		6 (27)	

N, número total de doentes agrupados por cada fator de análise; n, número de doentes com contagens absolutas de cada subpopulação celular T superior ao segundo quartil (P75%) da distribuição total na população de doentes estudada aos 12 meses de evolução; % frequência desta proporção de doentes; OR (95%CI), odds Ratio e intervalo de confiança 95%; aGvHD, doença de enxerto contra hospedeiro aguda; cGvHD, doença de enxerto contra hospedeiro crônica; CsA, ciclosporina A; MTX, metotrexato, FK506,

\* Doentes agrupados com base nas contagens células T CD4+ recentemente emigradas do timo <P10% e >P50% da distribuição de valores aos 6 meses de evolução dos transplantes.

\*\* Doentes agrupados com base nas contagens de sjTRECc (<P25% e >P50%) estabelecidos a partir da distribuição total em cada população de doentes) aos 12 meses pós-transplante.

Esta análise, no entanto, não conseguiu provar a mesma correlação em relação ao compartimento T CD8<sup>+</sup>. Embora seja apontada uma tendência no sentido de uma maior recuperação das células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> naíves nos doentes mais jovens, a dimensão da população não permite obter significado estatístico.

Os níveis dos indicadores da atividade tímica CD4<sup>+</sup>RTEs e sjTREC<sub>s</sub> aos seis meses de evolução apresentam alguma capacidade prognóstica da dimensão da população de células T CD4<sup>+</sup> naíves aos 12 meses, mas não das populações celulares de memória. As contagens superiores aos 6 meses de células RTEs são correlacionadas com as contagens também superiores de células naíves totais aos 12 meses (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>: 46% versus 0, ver tabela 24). Em relação aos sjTREC<sub>s</sub>, foi observado que os doentes com níveis superiores de sjTREC<sub>s</sub> aos 6 meses apresentaram contagens superiores de células T CD4<sup>+</sup> naíves aos 12 meses, mas de novo, a dimensão dos grupos de doentes é demasiado reduzida para esta tendência assumir significado estatístico.

Em relação à análise do compartimento T CD8<sup>+</sup>, os dois grupos de doentes definidos com base nos níveis de sjTREC<sub>s</sub> aos seis meses de evolução apresentaram contagens similares do *pool* celular naíve CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (tabela 24).

Em relação à dimensão das populações celulares de memória dos dois compartimentos linfocitários T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, foram observadas correlações com dois fatores. O primeiro estabeleceu uma relação entre a incidência de infeções bacterianas e a dimensão da população de células de memória efetoras terminalmente diferenciadas CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>; dos doentes que não sofreram infeções bacterianas durante o período de análise uma proporção significativamente maior apresentou contagens celulares desta população celular na avaliação aos 12 meses (35% versus 8%, P=0.03). O segundo fator, estabeleceu uma relação entre a dimensão, aos 12 meses de evolução dos transplantes, das populações celulares de memória central T<sub>CM</sub> e efetoras terminalmente diferenciadas T<sub>EMRA</sub> do compartimento T CD8<sup>+</sup>, com a utilização de terapia profilática da rejeição e/ou GVHD baseada na utilização do FK506. Quando os doentes que fizeram FK506 são comparados com os que fizeram um regime baseado em ciclosporina A (CsA), foi notada, uma maior proporção no primeiro grupo, de contagens das populações celulares referidas acima do P75 da distribuição na população total (37% versus 6%, P=0.03; doentes com FK506 versus doentes com CsA).

De forma a avaliar o impacto da GvHD na recuperação e reconstituição dos dos compartimentos linfocitários T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, as dimensões das frações celulares naíves e subpopulações de memória dos doentes que desenvolveram esta complicação imunológica, foram comparadas no final do primeiro e do segundo

semestre após o transplante com as dos doentes livres de GvHD. No entanto, é importante referir de novo que a incidência de GvHD, nas várias formas aguda moderada, extensa e crónica foi relativamente baixa na população de doentes deste estudo. Daí resulta que a avaliação do impacto da GvHD, na reconstituição imunológica nestes doentes, foi observada maioritariamente como uma tendência com significado estatístico marginal.

Na tabela 25 são apresentados os resultados desta avaliação.

**Tabela 25 – Análise do impacto da GvHD sobre a linfopoiese T e desenvolvimento das populações de células T com diferenciação funcional.**

		noGvHD	aGvHD I	P*	aGvHD II-IV + cGvHD	P**
<b>6 meses</b>	<b>n</b>	35	9		8	
	<b>sjTREC</b> s	0.6 (0-8.2)	0.8 (0-4.4)	ns	1.3 (0.3-3.9)	ns
	<b>RTE'S</b>	4.6 (0.5-27)	2.6 (0.5-13.5)	ns	4 (1.2-19)	ns
	<b>CD45+CD27+</b>	23 (3.6-84.5)	34.5 (4.5-84.9)	ns	18.3 (9.3-50)	ns
<b>CD4+</b>	<b>CD45-CD27+</b>	96.7 (51.8-165)	119.2 (67-182)	ns	86.1 (55-126)	ns
	<b>CD45-CD27-</b>	20.4 (12.7-71.4)	26.3 (8.4-82)	ns	13.8 (9.9-30.9)	ns
	<b>CD45+CD27-</b>	2.5 (0.5-8.3)	4 (1.5-17.5)	ns	1.6 (0.8-18)	ns
	<b>CD45+CD27+</b>	91.4 (40.6-131.8)	107.9 (57.7-385.5)	ns	183.2 (43.3-283.4)	ns
	<b>CD45-CD27+</b>	89.8 (46.2-244)	128.3 (92.8-195.9)	ns	102.6 (32.9-140.7)	ns
<b>CD8+</b>	<b>CD45-CD27-</b>	38.5 (4.8-89)	104.3 (66.4-197.3)	0.03	23.4 (4.9-77.5)	ns
	<b>CD45+CD27-</b>	64.3 (6-253)	244.2 (202-412.3)	0.046	195.5 (20.7-323.4)	ns
<b>12 meses</b>	<b>n</b>	31	9		8	
	<b>sjTREC</b> s	3.4 (1.5-37.9)	0.4 (0.1-4.2)	ns	0.4 (0.1-2.8)	0.01
	<b>RTE'S</b>	24.3 (4-102)	6.2 (3.5-48.5)	ns	4 (1.2-5.8)	0.01
	<b>CD45+CD27+</b>	55 (15.6-177)	18.4 (10-94.3)	ns	12.9 (6.8-68.3)	0.04
<b>CD4+</b>	<b>CD45-CD27+</b>	180.7 (94.5-246)	118.6 (101.6-196)	ns	140.1 (62.5-162)	ns
	<b>CD45-CD27-</b>	33 (17.5-76.7)	42.6 (13.2-104)	ns	25.2 (8.9-61.8)	ns
	<b>CD45+CD27-</b>	3	3.8	ns	0.6	ns

	(0.4-11.4)	(0.9-21.8)		(0.2.18.5)		
<b>CD8+</b>	<b>CD45+CD27+</b>	131.8 (81.4-309.6)	108.9 (60.4-143.1)	ns	116.5 (70.4-227)	ns
	<b>CD45-CD27+</b>	137.8 (66.6-240.3)	99.9 (68-205.6)	ns	83.5 (53.5-101.6)	0.046
	<b>CD45-CD27-</b>	46.8 (8.4-241.5)	70.2 (19.9-287.9)	ns	24 (7-68.4)	ns
	<b>CD45+CD27-</b>	251.4 (10-332.5)	285.7 (39-445.3)	ns	120.7 (43.2-281.8)	ns

GvHD, doença de enxerto contra hospedeiro; noGvHD, doentes sem GvHD nas formas aguda ou crónica durante o período de avaliação de 12 meses; aGvHD I, com GvHD aguda de extensão muito baixa; aGvHD II-IV com GvHD aguda moderada a extensa; cGvHD, com GvHD crónica. Os valores representam a contagem absoluta de cada população celular ou de sjTRECs (mediana (IQR)/ $\mu$ l sangue) aos 6 e 12 meses após o transplante. P, valor da comparação das contagens de cada população celular entre doentes livres de GvHD e doentes com aGvHD I (\*), com aGvHD II-IV + cGvHD (\*\*)

No ponto de análise aos seis meses, não foram notadas diferenças significativas nos doentes com e sem diagnóstico de GvHD para as várias frações celulares do compartimento T CD4<sup>+</sup>. No entanto, aos 12 meses, os doentes com GvHD apresentam contagens dos indicadores da timopoiese sjTRECs e CD4<sup>+</sup> RTEs mais baixas, do que o grupo de doentes livres desta complicação. A redução é notada em ambos os grupos com GvHD aguda moderada e GvHD mais extensa ou crónica, mas só no segundo grupo atinge significado estatístico (tabela 25). Esta redução tem impacto no pool celular naïve CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> dos doentes com GvHD.

No compartimento celular T CD8<sup>+</sup>, foram observadas alterações aos seis meses de evolução nas frações celulares de memória efetora e efetora terminalmente diferenciadas, que apresentaram uma expansão significativa nos doentes com aGvHD de grau I. Aos 12 meses foi observada uma redução marginal da população de memória central nos doentes com GvHD mais extensa ou crónica.

## 5. Discussão e Conclusões

Os doentes submetidos a transplante de células estaminais hematopoiéticas são inicialmente sujeitos a um regime de condicionamento mieloablativo com quimioterapia e/ou radioterapia de alta intensidade. No transplante autólogo é feito com o objetivo de erradicar uma doença tumoral, enquanto no transplante alogénico tem uma função cito-redutora e imunossupressora, que potencia o enxerto; a partir do qual é adquirido um efeito antitumoral [347]. Estes regimes de elevada citotoxicidade são agressivos para o organismo e conduzem ao desenvolvimento de um quadro grave de efeitos no doente, que implica um suporte clínico hospitalar diferenciado com uma particular atenção dedicada à sua estabilidade hemodinâmica, à hemóstase e à prevenção de infeções [348]. De facto, dos efeitos do condicionamento destacam-se, uma aplasia medular relativamente prolongada que é causa de uma pancitopenia severa e a que se associa uma contração de várias populações celulares imunocompetentes. Desta forma, os doentes com transplante de células estaminais hematopoiéticas, quer autólogo, quer alogénico, passam necessariamente por um processo de regeneração com recuperação hematológica e posterior reconstituição dos repertórios estruturais e funcionais das células dos braços inato e adaptativo da resposta imunológica.

Neste trabalho foi avaliado o processo de regeneração hemato-imunológica após o transplante de células estaminais hematopoiéticas. No primeiro ano após os transplantes, foram analisadas as dinâmicas de recuperação dos repertórios celulares imunocompetentes, a sua maturidade e reconstituição da diversidade estrutural clonotípica, assim como, os fatores que são potencialmente condicionantes destes processos. Para isso, foram estudadas duas séries transversais de doentes de um único centro de transplantação, a primeira sujeita a transplante de células autólogas e a segunda com enxertos alogénicos.

### 5.1. Sobre a Análise da Consolidação da Recuperação das Populações Celulares Imunocompetentes Derivadas da Mielopoiese

A recuperação hematológica do transplante é clinicamente definida com base nos seguintes parâmetros [349]:

- a recuperação da eritropoiese, definida como o primeiro dia a partir do qual o nível de hemoglobina excede o valor de 8.0 g/dl sem que tenha havido uma transfusão nos 28 dias anteriores,
- a recuperação plaquetária, como o primeiro dia em que a contagem de

plaquetas excede a contagem absoluta de 20.000 células/ $\mu$ l sem transfusões nos 7 dias anteriores e

- a recuperação dos neutrófilos, como o primeiro dia a em que a contagem destas células excede a contagem de 500 células/ $\mu$ l (ANC >500) por três dias consecutivos.

A saída da aplasia peri-transplante com a função do enxerto é definida através da determinação destes períodos. Diversos estudos sobre a análise deste arranque hematológico indicam que a dosagem de células CD34<sup>+</sup> do enxerto é o principal fator condicionante da recuperação hematológica [350, 351] que está diretamente associado à diminuição da mortalidade relacionada com o transplante e portanto à sobrevivência [352]. Nestas duas séries de doentes a capacidade de recuperação das contagens de eritrócitos e plaquetas estão diretamente relacionadas com fatores como uma menor idade ao transplante e o estadio da doença, o que indica uma otimização das dosagens celulares dos enxertos utilizados nos transplantes (resultados não mostrados).

A saída da neutropénia (ANC>500) em particular, é um evento clinicamente relevante que indica a recuperação mieloide e também o início da reconstituição imune [353, 354]. Neste estudo, foi avaliado não a cinética do arranque hematológico, mas a dinâmica da neutropoiese desde o início da evolução de longo prazo dos transplantes (90-100 dias) até a um ano de evolução.

Na série de doentes com enxerto autólogo, a frequência de doentes neutropénicos foi sempre baixa em todos os pontos de análise. As dosagens celulares dos enxertos (4.8 (2.0-16)  $\times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/Kg) (mediana, variação) permitiram a aquisição de uma neutropoiese de longo termo relativamente normal e estabilizada. Quando comparadas as capacidades de recuperação de neutrófilos entre os doentes cujos enxertos apresentaram dosagens celulares abaixo do primeiro quartil (P25%:  $<2.7 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/Kg) e acima do terceiro quartil (P75%:  $>5.2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/Kg) da distribuição de células de todos os enxertos não foram observadas diferenças significativas. Há indicação de que um fator de condicionamento da recuperação hematológica de longo prazo pode ser a viabilidade celular dos enxertos após o processamento [355]. Estes resultados obtidos numa série de doentes consecutivos da mesma Unidade de Transplantação são indicadores importantes de um processo eficiente de recolha de células CD34<sup>+</sup> e processamento dos enxertos. É ainda importante referir um fator observado com impacto potencial na gestão clínica dos doentes, o risco elevado de infeções associado à dificuldade da recuperação de uma neutropoiese normal.

Em relação aos doentes com aloenxerto, cerca de 80 % apresentaram aos 12 meses

uma reconstituição de todas as populações celulares derivadas da granulopoiese para valores comparáveis aos da população controlo. Nesta série de doentes é observado que o tipo de enxerto surge como um fator condicionante de uma consolidação normal das contagens da neutropoiese. De facto, os doentes com um enxerto derivado de células de medula óssea (MO) apresentaram uma maior dificuldade em reconstituir contagens celulares de neutrófilos no intervalo normal, quando comparados, com os doentes com um enxerto de células estaminais e progenitoras mobilizadas para o sangue periférico (PBSC). Esta diferença foi evidente na avaliação aos 3 meses, foi mantida no ponto de avaliação intermédio e ainda aos 12 meses de evolução dos transplantes. Devido às características da celularidade do enxerto de MO, estes apresentam como vantagem principal, uma incidência menor de doença de enxerto contra hospedeiro severa comparativamente aos transplantes com PBSCs [356, 357]. Nesta série de doentes, 75% dos transplantes com MO foram realizados em crianças (mediana de idade: 8, (3-15) anos). Foi avaliado se a dosagem de células CD34<sup>+</sup>, tal como descrito [351], apresentava correlação com a idade e verificou-se que mesmo nas crianças, a dosagem de CD34<sup>+</sup> dos enxertos de MO era significativamente inferior à dosagem das mesmas células nos enxertos de PBSCs (MO: 2.3 (1.6-8.7) vs. PBSCs: 4.8 (2.4-32) CD34<sup>+</sup>/kg; P<0.05).

Desta forma, ainda que esteja bem estabelecida a dependência do arranque da recuperação hematológica com a dosagem de células do CD34<sup>+</sup> enxerto, este estudo deixa também a indicação de que o mesmo fator, em particular nos aloenxertos de MO, poderá ser condicionante da consolidação da neutropoiese. Outros fatores associados à diminuição da capacidade de recuperação das contagens de neutrófilos na primeira fase do pós-transplante, são a doença primária de natureza maligna e a incidência de recidivas e vêm na linha de descrições anteriores [358].

Uma outra linhagem celular derivada da mielopoiese é a monocítica, que compreende os monócitos circulantes e as populações heterogéneas de células do sistema mononuclear fagocítico incluindo os fagócitos tecidulares e células dendríticas. Enquanto a reconstituição das células dendríticas devido ao seu papel transversal na modulação das respostas imunológicas inatas e adquiridas tem sido alvo de diversos estudos, já a recuperação dos outros compartimentos celulares está menos caracterizada. As células dendríticas apresentam uma recuperação inicial com uma cinética rápida, característica da linhagem mieloide [359]. No entanto as subpopulações mDCs e pDCs apresentam normalmente evoluções diferentes [360]. As primeiras que são suscetíveis a fatores de crescimento usados no pós transplante (G-CSF) e [359] apresentam-se dominantes enquanto as segundas são contidas devido à sua elevada sensibilidade aos regimes imunossupressores [361].

Neste estudo a análise da consolidação da monoipoiese no pós-transplante foi muito mais simples e avaliou somente a população de monócitos circulantes dominantes (CD45<sup>+</sup>CD14<sup>++</sup>). Ambos os grupos de doentes apresentaram uma dinâmica de evolução semelhante sem diferenças significativas entre tempos de análise. A recuperação de monócitos tem vindo a ser definida como o primeiro dia em que as contagens celulares são superiores a 300 cél/ $\mu$ l durante os primeiros 60 dias após o transplante. À semelhança de outras populações celulares derivadas de progenitores mieloides, a recuperação dos monócitos está relacionada principalmente com a dosagem celular do enxerto [352].

Foi observado que logo aos 3 meses a maioria dos doentes das duas séries apresentavam contagens celulares normais e no ponto final de análise cerca de 80% dos doentes apresentou este compartimento celular completamente recuperado. Foi notada uma maior frequência de doentes com contagens de monócitos normais no grupo com enxertos com maiores contagens de CD34<sup>+</sup>, mas as diferenças observadas não atingiram o limiar do significado estatístico.

Nos transplantes alogénicos a função mielóide dos enxertos foi monitorizada em relação à origem genotípica das células CD33<sup>+</sup> (marcador expresso por granulócitos e monócitos). Verificou-se que na recuperação, estes compartimentos celulares são derivados da função enxerto ao apresentarem uma elevada frequência de quimerismo dador. Durante o período de consolidação foi observado um quimerismo decrescente, imputável à recaída da doença primária de origem mielóide em alguns doentes e a um caso de quimerismo 'split' em que o doente regenerou uma linhagem linfóide maioritariamente de dador e uma linhagem mielóide totalmente autóloga.

Em conclusão, os resultados desta análise revelam que a consolidação da recuperação mielóide deverá ser definida essencialmente pelos mesmos fatores que condicionam o arranque hematológico, onde a dosagem celular do enxerto apresenta um papel fundamental.

## **5.2. Sobre a Recuperação e as Características do Compartimento de Células NK após o Transplante Alogénico e Autólogo**

As células NK estão profundamente envolvidas na primeira fase das respostas imunológicas inatas a transformações celulares derivadas das infeções virais e da tumorigénese. Apresentam funções efetoras de citotoxicidade direta com a libertação dirigida de moléculas citolíticas e indireta mediada por anticorpos. Por outro lado, são produtoras eficientes de citocinas e quimiocinas que fazem a ativação e modelação de outras células imunocompetentes, incluindo as da resposta adaptativa. É importante

referir que as capacidades de ativação e resposta das células NK decorrem sem a necessidade do reconhecimento de antígenos tumorais específicos ou de uma sensibilização anterior [362]. No contexto da evolução do transplante de CEHs, tem havido um interesse elevado em relação à reconstituição e restabelecimento das funcionalidades das células NK. De facto, esta população celular apresenta uma recuperação numérica rápida logo após o transplante e tem sido demonstrado que são responsáveis por um efeito aloreativo, no sentido do enxerto contra o tumor, que supõe-se ser clinicamente relevante em termos de aumento de sobrevida e tempo de livre de doença [363-365].

Em condições normais, o compartimento celular NK do sangue periférico é constituído por várias subpopulações, a maioritária (até 90%) tem o fenótipo  $CD56^{dim}CD16^+$  e apresenta uma diferenciação madura com expressão de um repertório de recetores para um controlo das capacidades e atividades citotóxicas e pro-inflamatórias, que inclui os KIR. São também detetadas no sangue células NK com uma expressão elevada de CD56 e uma expressão baixa ou ausente de CD16 ( $CD56^{++}CD16^{-/+}$ ). Estas células apresentam com capacidade citotóxica baixa, mas são produtoras muito eficientes de citocinas imunoreguladoras, como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 [366]. As células NK  $CD56^{++}$  expressam constitutivamente os recetores CCR7 e CD62L e os recetores de citocinas com a cadeia comum  $\gamma$ , o que lhes confere respetivamente, fortes capacidades migratórias e proliferativas [367]. Estas células são dominantes nos tecidos linfoides onde provavelmente fazem a maturação para as células citotóxicas  $CD56^{dim}CD16^+$ .

Tem sido uma observação consistente, que os transplantes alogénicos com enxertos sujeitos a uma depleção extensa das células T fazem uma reconstituição deficiente das células NK, o que afeta a evolução clínica dos doentes. Desta forma, foi sugerido que as células T do enxerto influenciam o desenvolvimento e maturação das células NK após o aloTCE [368-370].

Neste trabalho, foi avaliada a recuperação das populações celulares NK e a reconstituição do repertório de recetores KIR após o transplante alogénico e autólogo. É importante referir que no transplante alogénico a reconstituição das células NK é um processo bem caracterizado, mas tanto quanto foi possível avaliar, num modelo autólogo nunca foi feita uma análise extensiva da cinética da reconstituição com uma avaliação detalhada das subpopulações de células NK. Os dois modelos de transplantação de células estaminais hematopoiéticas apresentam uma diferença fundamental. No transplante alogénico é necessário o suporte de um regime imunossupressor para a profilaxia e controlo dos fatores de morbilidade associados à aloreatividade. Esta imunossupressão é condicionadora essencialmente do

desenvolvimento de respostas imunológicas derivadas das células T. Já os doentes com enxerto autólogo não estão sujeitos durante a recuperação, a quaisquer regimes imunomoduladores para além dos efeitos do condicionamento do transplante.

No primeiro ponto de avaliação, os dois grupos de doentes com auto e alo- transplante apresentaram uma recuperação quantitativa das células NK equivalente. No entanto, a composição do compartimento periférico de células NK apresentou diferenças significativas entre os dois grupos de doentes e também com a população controlo. Em linha com a descrição de estudos anteriores [365, 370, 371], os doentes com transplante alogénico, apresentaram uma expansão forte das populações de células NK imaturas  $CD56^{++}CD16^{-/+}$  associada a uma depleção da população de células maduras  $CD56^{dim}CD16^{+}$ . Esta distorção da composição do compartimento periférico de células NK foi mantida durante o primeiro ano de evolução dos transplantes alogénicos. Já a mesma análise nos doentes com enxerto autólogo revelou uma alteração mínima das frequências de células NK imaturas  $CD56^{++}CD16^{-/+}$  em relação aos níveis normais da população controlo. Esta é uma observação importante deste trabalho, e tanto quanto foi possível apurar não foi anteriormente descrita.

Com a evolução do transplante alogénico verificou-se uma normalização lenta e progressiva da composição do compartimento periférico de células NK. A expansão inicial das células  $CD56^{++}$  foi progressivamente regularizada, e aos 12 meses, estes doentes apresentaram contagens absolutas destas populações celulares no limite superior do intervalo normal significativamente inferiores à análise inicial. Já a população de células NK maduras  $CD56^{dim}CD16^{+}$  permanece reduzida e sem alterações quantitativas durante o todo o período de avaliação.

No grupo de doentes com transplante autólogo, foi possível notar uma maior capacidade de maturação das células NK. As populações de células NK maduras  $CD56^{dim}$  e as terminalmente diferenciadas  $CD56^{-}CD16^{+}$  apresentam níveis celulares um pouco acima do limite inferior dos intervalos normais desde os 6 meses de evolução.

Tal como exposto na secção 4.2.3. deste trabalho, ambos os grupos de doentes apresentam os mesmos desequilíbrios na composição do compartimento periférico de células T. Durante todo o período da análise, houve uma inversão muito pronunciada da relação de células T  $CD4^{+}/CD8^{+}$  e também prevaleceram de forma muito evidente as subpopulações de células T de memória em relação às naïves. Por outro lado, e de uma forma não surpreendente, os doentes com transplante alogénico que foram sujeitos a profilaxias e/ou tratamentos imunossupressores apresentaram uma dinâmica de recuperação das populações de células T  $CD4^{+}$  e  $CD8^{+}$  inferior aos doentes com transplante autólogo. Como resultado, a dimensão do compartimento de

células T CD4<sup>+</sup> dos doentes com transplante autólogo é superior ao dos doentes com transplante alogénico aos 3 meses (273.8 (179-362) versus 106.9 (42-200) cél./ $\mu$ l;  $p < 0.0001$ ), aos 6 meses (281.5 (186-392) versus 198.0 (96-288) cél./ $\mu$ l;  $p < 0.001$ ) e aos 12 meses após o transplante (351.8 (259-504) versus 247.6 (153-245) cél./ $\mu$ l;  $p = 0.03$ ). Quanto ao compartimento celular T CD8<sup>+</sup>, comparativamente aos doentes com transplante alogénico, os doentes com transplante autólogo apresentam contagens celulares superiores aos 3 meses (640.8 (367-1006) versus 264.9 (91-491) cél./ $\mu$ l;  $p < 0.0001$ ) e aos 6 meses (472.4 (337-870) versus 333.7 (143-680) cél./ $\mu$ l;  $p < 0.01$ ), mas aos 12 meses, a diferença já não é significativa.

O padrão de recuperação das células NK observado aqui para cada um dos modelos de transplantação, está em linha com o envolvimento das células T do enxerto sugerido anteriormente [368]. Numa condição de níveis muito diminuídos de células T, como o verificado no transplante alogénico, uma proporção elevada de células NK em circulação apresentou os fenótipos imaturos CD56<sup>++</sup>. Já os doentes em recuperação do transplante autólogo com níveis superiores de células T apresentaram uma maior capacidade de maturação das células NK CD56<sup>dim</sup>, sem uma acumulação excessiva das subpopulações de células imaturas CD56<sup>++</sup>. Foi também investigado, nos dois modelos de transplantação, a ligação específica das populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com a reconstituição das células NK. Observou-se nos doentes com níveis baixos de células T CD4<sup>+</sup> uma expansão significativa das células imaturas CD56<sup>++</sup> enquanto os doentes com contagens superiores de CD4<sup>+</sup> apresentaram um compartimento de células NK mais maturo. Verificou-se um impacto semelhante, mas menos extenso, em relação aos níveis de células T CD8<sup>+</sup> com as proporções de células NK maduras e imaturas dos doentes no pós-transplante. É importante referir que, na avaliação aos 3 meses esta modulação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> sobre a reconstituição do compartimento celular NK foi observada de forma consistente nos dois modelos de transplantação. Contudo, aos 6 meses a correlação foi significativa apenas para os doentes com autoTCE com diferentes níveis de células T CD4<sup>+</sup>.

Estes diferentes padrões dinâmicos das diferentes subpopulações de células NK no sangue periférico, nos dois grupos de doentes, são sugestivos de uma recuperação celular dirigida numa primeira fase por citocinas. É bem conhecido que a recuperação linfocitária após o TCEH é modelado por um aumento para níveis não fisiológicos de determinadas citocinas, com uma atividade fundamental na diferenciação e homeostasia das populações linfocitárias. Estas citocinas são produzidas em grande quantidade por células dendríticas, monócitos e células do estroma dos tecidos linfoides primários e secundários durante e após o condicionamento do transplante

[372, 373]. As citocinas mais relevantes neste processo são da família da cadeia comum  $\gamma$  ( $\gamma$ c) como a IL-2, a IL-7 e em particular a IL-15. Estas citocinas atuam sobre as populações celulares sensíveis de uma forma autocrina ou paracrina no caso da IL-15, e induzem a sua sobrevivência e proliferação [374, 375]. Logo após o transplante, as células com expressão constitutiva dos recetores de alta afinidade da IL-2 e IL-15, como as células T CD8<sup>+</sup> de memória e as células NK imaturas CD56<sup>++</sup> [376], são altamente expandidas com a exposição sistémica a estas citocinas [371, 373, 377].

É provável, que as diferenças observadas nos grupos de transplantes em relação à reconstituição do compartimento de células NK seja devido a um efeito competitivo entre as T CD8<sup>+</sup> e NK CD56<sup>++</sup> pela IL-15 disponível nos primeiros períodos do processo de recuperação. Os níveis mais elevados de células T CD8<sup>+</sup> presentes nos transplantes autólogos conduzem a um maior consumo e depleção das citocinas homeostáticas, condicionando tal como observado, a expansão das células NK CD56<sup>++</sup>. Já nos transplantes alogénicos, a dimensão inicial menor da população de células T CD8<sup>+</sup> deverá conduzir a um menor consumo de citocinas permitindo uma maior exposição das células NK CD56<sup>++</sup>, o que poderá ser responsável pela expansão destas células observada nestes doentes.

Outras linhas de evidências apontam outros mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento e maturação das células NK, que incluem uma interação com as células dendríticas e também com as células T CD4<sup>+</sup> [378-380]. Esta verdadeira interação entre braços celulares da imunidade inata e adquirida é suportada desde logo com a demonstração de uma co-localização das células NK CD56<sup>++</sup> e das DCs no paracortex dos nódulos linfáticos, que são as áreas ricas em células T [381]. Aqui, deverá ter lugar uma série de interações celulares que incluem, a apresentação trans da IL-15 pelas DCs e produção de IL-12 que deverá induzir respetivamente a proliferação e ativação das células NK CD56<sup>++</sup> [378, 381]. Esta estimulação das células imunoreguladoras NK deverá aumentar a sua produção de IFN- $\gamma$  e conduzir a uma polarização Th1 das células T CD4<sup>+</sup> [382]. Desta forma, a IL-2 produzida nestas condições pelas células T, poderá induzir a maturação das células NK com a aquisição do fenótipo maturo CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> e a expressão de KIR [376, 383]. Para além disso, tem sido verificada uma atividade citolítica das células NK maduras dirigida especificamente contra as DCs imaturas, que se julga ser um mecanismo que durante a iniciação das resposta imunes faz a seleção de uma população de DCs altamente imunogénicas [378]. Este mecanismo, foi mesmo proposto como sendo responsável por uma ablação preferencial das DCs do recetor de transplante alogénico, o que resulta num controlo da doença de enxerto contra hospedeiro que tem sido sugerido

ser mediado por células NK maduras aloreativas [367, 384].

Estas interações mediadas por citocinas sugerem que o desenvolvimento das células NK pode ser fortemente modelado por quantidades limitantes de citocinas e também pelos níveis das células produtoras das mesmas citocinas.

Outros mecanismos regulatórios, envolvendo por exemplo células Treg ou outros como o efeito inibidor da ciclosporina especificamente sobre a população celular CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> [385], não podem por enquanto ser excluídos na análise da maturação do compartimento NK pós-transplante. No entanto, a observação neste trabalho de que os doentes com os maiores níveis iniciais de células T CD4<sup>+</sup> apresentam uma melhor capacidade para reconstituir subpopulação de células NK maduras é consistente com os modelos apresentados. Em particular, este efeito deverá ser muito provavelmente uma consequência da IL-2 produzida pelas células T que induzem a maturação das células NK CD56<sup>++</sup> imaturas.

### **5.3. Sobre a Diversidade Genética do Repertório KIR, a Alocação e Reconstituição dos KIRs no Pós-Transplante e a Distribuição de Interações com os Ligandos do Recetor**

Nesta parte do estudo começou-se por caracterizar a diversidade do cluster genético KIR e a sua organização estrutural numa população de 229 indivíduos não-relacionados com origem portuguesa. As frequências genéticas determinadas para os loci KIR foram concordantes com as respetivas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que permite afirmar que a selecção de indivíduos do estudo genético foi aleatória e os resultados podem ser extrapolados para uma caracterização da população portuguesa em geral. A distribuição da frequência dos vários genes KIR genes e a sua organização, revelou uma proximidade às populações caucasianas europeias, em que há um maior balanço das frequências dos haplótipos A e B dos genes KIR comparativamente a outras populações de longitudes inferiores.

É importante referir que este é um sistema genético que apresenta uma diversidade importante população, que pode ser maior, se for tida em conta também a variabilidade alélica que não foi avaliada neste trabalho. Foi observado um conteúdo individual de genes com intervalo relativamente alargado (entre 8 e 16 genes) e um total de 36 genótipos KIR diferentes, dos quais, metade pertenciam a um único indivíduo. As frequências alélicas dos vários genes KIR para a população portuguesa, foram comparadas com duas populações geograficamente próximas, uma espanhola e uma marroquina ocidental. Ao longo da história tem havido uma interação contínua, bem documentada, entre os portugueses e os espanhóis [386]. Já a população

marroquina tem permanecido mais isolada, o que é confirmado por um baixo nível de diversidade genética em relação a alguns marcadores genéticos [387-389]. Ainda assim, está documentado algum grau de fluxo genético de algumas populações da Europa mediterrânica ocidental, como a francesa, espanhola e portuguesa sobre a população de Marrocos [390]. A distribuição de genes KIR encontrada nos portugueses e espanhóis não apresentou diferenças significativas. No entanto, vários loci KIR (3DL3, 2DL2, 2DL3, 2DL5 e 2DS3) apresentaram uma distribuição diferente na população marroquina. Acima de tudo notou-se na população marroquina uma distribuição mais equilibrada de 2DL2/2DL3 e uma menor frequência de 2DL5 e 2DS3. Quanto à organização genómica, em geral a distribuição de arranjos centroméricos e teloméricos KIR na população portuguesa revelou-se similar à descrita noutras populações com uma ascendência relacionada. A única exceção observada foi uma frequência ligeiramente superior na população portuguesa do genótipo Cen-A/B, que noutros estudos vem referida como sendo equivalente à Cen-A/A [328, 391]. É importante referir que os motivos Cen-B/B e Tel-B/B, que são precisamente os que têm vindo a ser associados com uma evolução clínica favorável dos doentes com AML sujeitos a transplante alogénico são os menos frequentes na população (Cen-B/B, 11.5% e Tel-B/B, 4.7%). Em linha com que está descrito o desequilíbrio de associação genético no cluster KIR está restrito às regiões centroméricas e teloméricas balizadas no haplotipo pelos genes estrutura 3DP1 e 2DL4 [392]. No entanto, não é observado desequilíbrio de ligação entre as regiões teloméricas e centroméricas. Através dos conteúdos individuais de motivos Cen e Tel, foi inferida a organização dos haplotipos completos e estabelecida a sua frequência na população portuguesa. O genótipo A/B apresentou a frequência mais elevada (41.7%) e o B/B apresentou a menor frequência (11.5%).

Já foi referido e demonstrado aqui, que as células NK derivadas do enxerto fazem uma recuperação numérica rápida após o condicionamento mieloablativo. Alguns estudos, os mais significativos são meta-análises genéticas, têm vindo a avaliar a correlação entre o potencial aloreativo das células NK e o controlo da doença residual mínima leucémica após o transplante. Este efeito pelas células NK tem-se verificado ser clinicamente relevante. No entanto, parece depender de múltiplos fatores que incluem o tipo de doença, a presença de células T, da imunossupressão usada, dos repertórios de genes KIR alocados com o enxerto e dos ligandos dos recetores [299, 393]. Embora não esteja uniformemente demonstrado, a captura de um efeito aloreativo mediado por células NK deverá integrar no caso dos recetores inibitórios, uma interação de um KIR do enxerto com uma incompatibilidade HLA classe I do parador-recetor ou então a alocação de um locus KIR para o qual o recetor não possui o

ligando [394]. No caso dos recetores de ativação, têm sido proposto modelos que preveem uma interação KIR/ligando modeladora da educação das células NK que induza uma diminuição do limiar da ativação destas células [329, 333, 334]. Desta forma, tem vindo a ser proposto que a definição imunogenética do sistema KIR nos doadores de transplante poderá ser um fator ter em consideração para um progresso clínico favorável dos transplantes alogénicos [302, 328]. Foi demonstrado primeiro, que nos doentes com LMA, os transplantes realizados com um dador contendo o haplotipo KIR B apresentavam uma menor incidência de recidiva e também um maior período de sobrevida [302]. De seguida, mapearam-se estes efeitos clínicos vantajosos ao conteúdo, no dador de motivos Cen-B, ricos em genes KIR de ativação, e numa menor extensão também com a presença dos motivos Tel-B [328]. Mais recentemente, foi proposto um modelo que classifica os genótipos KIR dos doadores em neutros, bons e melhores a partir da soma e tipo dos conteúdos de motivos KIR B [332]. Com base nos resultados destas análises genéticas, têm surgido propostas para a consideração da família de genes KIR como um segundo sistema genético, para além do HLA, a ter em consideração na seleção dos pares dador/recetor para o transplante alogénico devido a LMA [395].

Nesta parte do trabalho, foi avaliada a alocação de perfis genotípicos KIR e a distribuição de interações com os ligandos do recetor resultante na transplantação alogénica. Uma vez que a alocação de genes KIRs não é dirigida por um processo de seleção, o repertório de genes KIR na transplantação é determinado pela frequência dos genes KIR na população de doadores. Genes com uma frequência elevada como os 2DL1, 2DL3, 3DL3 e 2DS4 são facilmente alocados em todos os transplantes. No entanto, os genes KIR de baixa e até de média frequência apresentam uma distribuição muito heterogénea na transplantação alogénica. Nos transplantes com dador relacionado, devido à relação genética chegada, há uma maior probabilidade de uma alocação de genes de idênticos ao repertório do recetor, em particular para os genes de frequência média como os 2DL2, 2DL5 e 2DS3. Os genes de frequência mais baixa como os 2DS1, 2DS3, 2DS5 e 3DS1 são de alocação difícil, e em geral, somente 30 a 40% dos enxertos apresentam estes genes em diferentes combinações. A distribuição de motivos teloméricos e centroméricos com conteúdos B foi avaliada em transplantes com pares dador-recetor com diferentes graus de proximidade genética. Nos doadores relacionados, observou-se uma frequência superior do motivo Tel-A em relação aos grupos de doadores não-relacionados do painel local e também do painel internacional. Só esta pequena diferença nas frequências genéticas teve como consequência uma prevalência superior de enxertos relacionados com conteúdos KIR neutros comparativamente aos grupos de transplantes com dador não-

relacionado. Foi igualmente avaliada a frequência de ligandos HLA classe I dos KIR nos recetores de cada tipo de transplante. Observou-se nos doentes uma distribuição equilibrada dos alotipos HLA C1 e C2 (ligandos dos KIR2DL2/3 e 2DL1/S1, respetivamente). A heterozigotia C1/C2 é o genótipo dominante com uma frequência média de 49,8%, seguido da combinação homozigótica C1/C1 com 28.5% e finalmente da C2/C2 com 21.7%. A segunda classe de ligandos é constituída pelos alotipos HLA A e B com o motivo Bw4 reconhecidos pelo KIR3DL1. A frequência média dos alotipos Bw4+ nos doentes foi de 75.8%. O Bw4 apresenta um dimorfismo entre uma isoleucina e uma treonina na posição 80, que modela a afinidade dos recetores KIR específicos para este ligando [331]. A forma de maior afinidade Bw4I80 apresenta uma frequência dominante e somente cerca de 22.0% dos doentes Bw4+ apresentaram unicamente alotipos HLA-B com a forma Bw4T80.

De seguida foram consideradas as interações KIR do dador – ligando do recetor resultantes do transplante. É importante notar que uma fração importante dos doentes (37.4%) apresentou um repertório completo dos ligandos HLA classe I (doentes C1/C2 e Bw4+) para os vários KIR inibitórios. Para estes transplantes não são previsíveis reações alorreativas mediadas por células NK induzidas por interações KIR e a ausência do ligando. A distribuição das interações KIR2DL1 e 2DL2/3 envolvendo respetivamente a ausência de ligandos dos grupos C1 e C2, e também das formas do Bw4 reconhecidas pelo KIR3DL1, apresentou-se muito similar nos vários grupos de transplantes com dador relacionado e com dadores não relacionados do registo local e dos registos internacionais. Em relação às interações dos KIR de ativação, foi avaliada a interação 2DS1+/C2+ que foi observada com uma frequência equivalente em cada um dos grupos de transplantes. Quanto ao KIR3DS1, foi avaliada a alocação deste KIR nos recetores com os alotipos Bw4 e BwI80, embora sejam ligandos putativos. Verificou-se uma distribuição similar desta interação nos três grupos de transplantes.

Desta forma, resulta deste estudo a conclusão de que a frequência de interações KIR do dador – ligando do recetor potencialmente indutoras de um efeito alorreativo favorável à evolução clínica do transplante é em larga medida independente da proximidade genética do par dador/recetor. Este facto deve-se certamente à segregação independente do cluster de genes KIR e do cluster de genes do MHC que contém os genes HLA em que os doentes e recetores são compatibilizados. No entanto, para este resultado, também é importante o facto dos painéis de dadores utilizados nos transplantes apresentarem uma distribuição semelhante dos genes e motivos KIR. A informação aqui adquirida pode ser útil, pelo menos para os doentes LMA. Na situação de estarem identificados múltiplos dadores que reúnam critérios para a doação de CEHs, poderá ser feita uma selecção adicional do melhor dador com

base no repertório de genes KIR do dador e de ligandos presentes no recetor.

De seguida foi analisado o transcriptoma KIR durante o processo de reconstituição. A série de doentes com autoTCE revelou aos 3 meses de evolução uma expressão não completa do repertório germinal destes genes, que, no entanto, foi observada nos pontos posteriores da análise. Tendo em conta que a educação e licenciamento das células NK é modelada pelos ligandos HLA dos genes KIR [396-398], foi avaliada a presença/ausência dos ligandos HLA C1, C2 e Bw4 como fator determinante da desregulação inicial mas as diferenças observadas não apresentaram significado estatístico.

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a aquisição dos recetores KIR específicos HLA é sequencial, é feita a reconstituição 3DL1 com o ligando HLA-Bw4, seguida da 2DL2/3 com o ligando HLA-C(1) e finalmente da 2DL1 com o ligando HLA-C(2) [399, 400]. Pelo que propõem, poderá ser obtido um efeito aloreativo GvT precoce na falta de Bw4 no recetor [400]. Neste estudo foi observado que a dinâmica da recuperação KIR é variada entre recetores particulares. No pós-transplante o repertório de genes KIR expresso é marcado pelo quimerismo celular da população de células NK, sendo detetado um repertório misto dos genes autólogos e alogénicos que evolui progressivamente para um repertório completamente alogénico à medida que aumenta o quimerismo dador.

Estes resultados obtidos quer no contexto do transplante autólogo quer alogénico suportam o conceito de que a regulação da expressão dos genes KIR é totalmente estocástica dirigida por mecanismos diversos como a regulação epigenética [152] e transcrição variegada [154]. No entanto, como resultados de expressão genética não permitem conclusões alargadas à diversidade funcional das células NK durante este processo de reconstituição.

Desta forma, com estes resultados, conclui-se que após o transplante alogénico a recuperação de células NK é caracterizada por uma imaturidade prolongada provavelmente devido a uma maior sensibilidade da população celular imatura à citocinas homeostáticas e uma inibição específica das células maduras pela imunossupressão usada no controlo das complicações da aloreatividade imunológica. No transplante autólogo a recuperação da maturidade é mais evidente pela ausência destes fatores. Já a expressão genética do repertório da família de genes KIR revelou uma regulação derivada do processo ontogénico normal.

#### **5.4. Sobre a Diversidade Estrutural e Dinâmica da Reconstituição Quantitativa das Subpopulações de Células B**

Foi implementado nas duas séries doentes, uma análise indicativa da atividade linfopoiética B derivada da MO e uma avaliação quantitativa dos níveis periféricos das subpopulações celulares de linfócitos B maduras. Com um ensaio quantitativo do marcador molecular sjKRECs foi estimado o número de células B circulantes com origem na medula óssea [177]. Observou-se que em ambos os grupos de doentes, os mecanismos de neogénese das células B estão reestabelecidos aos 3 meses após o transplante e são mantidos em níveis normais ou superiores durante o período de análise.

A avaliação da diferenciação periférica das células B foi dirigida sobre dois compartimentos celulares, o das células transicionais com o fenótipo CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> [187] e o compartimento de células CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>. A primeira população, tal como esperado, apresentou uma expansão acentuada em ambos os grupos de doentes. A segunda população, de células mais maduras, esteve severamente contraída durante todo o período de avaliação. As células B transicionais representam uma ligação fundamental entre o compartimento de células B iniciais formadas na medula e o repertório maturo, selecionado com base na especificidade para os antígenos, em função da força dos sinais derivados do BCR [185]. Estas células que se caracterizam por uma baixa capacidade proliferativa, de sobrevivência e quimiotaxia, foram propostas como elementos alvo de uma seleção periférica com vista à deleção de células B ainda com potencial autoreativo que escaparam à seleção na medula [185]. Por outro lado, são células num contínuo de desenvolvimento definido fenotipicamente por uma expressão diferencial do CD24 e CD38 [186, 187]. Ao longo do primeiro ano de evolução dos transplantes observou-se a normalização progressiva deste compartimento celular. A frequência de células nos estadios de desenvolvimento primitivos T1 e T2 diminuiu e houve um aumento significativo das células no estadio T3/pré-naíve, o que torna evidente que não há uma acumulação de células num determinado estadio de desenvolvimento. Quando é estabelecida a correlação entre o número de sjKRECs e a quantidades absolutas de cada subpopulação de células B do sangue periférico, observam-se correlações que indicam um desenvolvimento lento, mas progressivo do compartimento de células B transicionais. Na primeira fase da evolução dos transplantes, as correlações são mais fortes e proporcionais às frações de células mais imaturas. Aos 12 meses após o transplante a fração celular B com a maior correlação com os sjKRECs é a naíve. Desta forma, com este trabalho surge uma primeira indicação de que a quantificação de sjKRECs durante o processo de recuperação dos transplantes, poderá servir não só para estimar a função do enxerto em relação à linfopoiése B, mas também para avaliar o contínuo de diferenciação do compartimento transicional de células B.

A análise do histórico de divisões celulares do compartimento total de células B e da diversidade do repertório *IGH* indica que não há proliferações celulares assinaláveis. As limitações da diversidade do repertório expresso estão associadas essencialmente a deficiências graves na linfopoiese B, reconhecidas como contagens absolutas de células B e de sjKRECs periféricos muito baixas. Nos doentes com uma forte dinâmica no processo de reconstituição do compartimento B não foram notadas expansões clonais, indicativas de proliferações homeostáticas semelhantes às observadas, por exemplo, no compartimento celular T. Foi no entanto, observada uma maior utilização das famílias de segmentos variáveis mais curtos e com menor complexidade germinal *IGHV2,5* e *6*, uma característica inicialmente reconhecida nas células B derivadas da ontogenia fetal [401, 402].

A expansão inicial do compartimento transicional é muito provavelmente devida a uma maior capacidade de sobrevivência destas células induzida pelo Baff (B-cell activating factor). O Baff é o principal modulador da homeostase do compartimento de células B induzindo a sobrevivência e diferenciação celular. A depleção dos compartimentos maduros de células B, em particular das células naïves, causa uma diminuição dos recetores celulares do Baff aumentando a sua disponibilidade para as células imaturas transicionais [403]. Em outros contextos, o aumento de Baff tem sido correlacionado com defeitos da homeostasia do desenvolvimento das células B. Nestas situações derivam células com potencial autoreativo envolvidas em condições autoimunes como o lúpus eritematoso sistémico ou síndrome de Sjogren's [404, 405]. No entanto no contexto da recuperação da linfopenia pós-transplante, alguns estudos sugeriram que uma recuperação robusta da fração pré-naïve das células B mantém um equilíbrio dos níveis de Baff e está correlacionada uma evolução sem complicações imunológicas em transplantes alogénicos [344, 406].

Com este trabalho é demonstrado pela primeira vez que a recuperação da linfopoiese B (níveis elevados de sjKRECS e de células transicionais nos pontos mais precoces da avaliação está relacionada com capacidade de recuperar aos 12 meses as populações de células B maduras.

Foram avaliadas várias frações celulares com o fenótipo terminalmente diferenciado. As células CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> foram propostas como uma população putativa de células humanas B1a produtoras de anticorpos IgM poliespecíficos naturais [407]. Estas células amplamente descritas nos murganhos, têm sido alvo de intensa discussão em relação a um fenótipo diferenciador e à sua própria existência nos humanos [338, 340, 408, 409]. Nos doentes do grupo com enxerto autólogo foi observada uma recuperação para níveis normais destas células aos seis meses de evolução. Nos doentes com transplante alogénico esta população celular apresenta

níveis normais somente aos 12 meses de evolução.

As células naïves CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup> são a única subpopulação a apresentar uma recuperação aos 12 meses para níveis normais em ambos os grupos de doentes. A recuperação da subpopulação de células de memória com recombinação de mudança de classe das Igs com (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) foi correlacionada com os níveis elevados de células T CD4<sup>+</sup>. Estas últimas células T, mais precisamente a subpopulação T<sub>FH</sub>, é responsável por facultar os estímulos da reação imune do GC de que resulta a diferenciação das células B de memória e plasmablastos Ag dirigida [410, 411]. Esta correlação não foi observada para uma segunda população de células de memória, as células de memória com expressão IgM. Estas células com o fenótipo CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> são maioritariamente células que fizeram a diferenciação MZ que é independente do estímulo auxiliador dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> [205, 412]. Os doentes apresentaram uma recuperação lenta desta população celular, e aos 12 meses de evolução, somente uma pequena fração dos doentes apresentaram contagens de células B CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> normais (25% dos doentes autoTCE e 12% dos aloTCE).

Em conclusão, a análise da reconstituição dos repertórios celulares B de ambas as séries de doentes é reveladora de que enquanto a ontogenia central na MO das células B é estabelecida rapidamente, a ontogenia periférica parece sofrer um processo de detenção a que se segue uma evolução muito lenta. No contexto autólogo, a idade mais avançada do doente ao transplante constitui o principal fator limitante da capacidade de reconstituição do repertório funcional maturo. No contexto alogénico, embora esta análise tenha um poder de definição limitado, a presença de GvHD parece ter um impacto muito severo sobre a linfopoiese B e conseqüentemente na regeneração de todo o compartimento celular. O mais provável é que esta deficiência dinâmica, seja uma consequência da menor capacidade das estruturas linfoides secundárias devido à agressão dos agentes mieloablativos e irradiação do condicionamento [413]; a que se associa um deficiente estímulo auxiliador pelas células T CD4<sup>+</sup>, que são afetadas por linfopenia severa, comum a todos estes doentes. Várias destas condições têm sido caracterizadas nos doentes em recuperação do condicionamento mieloablativo e TCE, como hipersplenia funcional e uma reconstituição das estruturas esplénicas prolongada e sequencial [414-416] para além de uma disfunção tímica muito severa e prolongada [373].

A análise de outras condições pré e pós-transplante na capacidade de reconstituição por estes doentes, das populações de células B maduras aos 12 meses de evolução, identifica como fatores com impacto significativo, a elevada atividade linfopoiética B precoce, mensurada como os níveis de sjKRECs no sangue periférico aos 6 meses,

ou em menor medida, as contagens de células transicionais. Esta correlação, que recentemente foi também sugerida noutro estudo [417], como poderão constituir uma forma de avaliar antecipadamente a capacidade de reconstituição do braço humoral da resposta imunológica pelos doentes submetidos a TCE.

### **5.5. Sobre a Reconstituição Quantitativa e Qualitativa dos Repertórios de Células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>**

A recuperação da competência imunológica após o transplante só é completa com o restabelecimento das contagens, das proporções e da diversidade do repertório estrutural do TCR das diferentes populações de células T. A incapacidade ou a demora em efetuar esta reconstituição, significa para os doentes, uma diminuição funcional da imunidade adaptativa em ambos os braços humoral e celular. Durante este período, os doentes apresentam uma suscetibilidade elevada a infeções oportunistas, à recidiva da doença tumoral e a complicações derivadas da aloreatividade [418].

A recuperação das contagens de linfócitos T é feita por duas vias diferentes. A primeira via incide sobre as populações de células T naïves e maduras derivadas do enxerto, e também autólogas, que resistiram ao condicionamento. Estas células sofrem expansões proliferativas periféricas pela ação de citocinas homeostáticas como a IL-7, a IL-15 e a IL-21, ou por ativação dependente de Ags, [373, 403]. A segunda via, é o processo da ontogenia das células T, a timopoiese, que gera novas células T naïves com um repertório TCR diverso.

O primeiro mecanismo constitui um processo natural de regulação da dimensão dos compartimentos de células T muito importante para a recuperação de condições linfopénicas naturais ou induzidas. O período peri-transplante do TCE é caracterizado por níveis elevados de IL-7 e IL-15. O número de células com recetores destas citocinas apresenta-se diminuído e concomitantemente há um aumento da produção por células do estroma da MO, células fibroblásticas reticulares dos tecidos linfóides e em menor quantidade por APCs [403]. No entanto, as diferentes populações de células T apresentam, uma sensibilidade e resposta diferente à exposição sistémica a estas citocinas [419, 420] o que se reflete na diversidade e proporcionalidade do repertório celular resultante [419].

A IL-7 regula preferencialmente as populações de células T com maior diversidade, naïves e RTEs, induzindo a proliferação e sobrevivência celular, e a condução para os tecidos linfáticos [421, 422]. Mas enquanto, as células T CD8<sup>+</sup> são fortemente expandidas pela exposição a níveis elevados de IL-7, as células T CD4<sup>+</sup> apresentam

uma expansão muito limitada nas mesmas condições [420]. A IL-7 regula diretamente a homeostasia do compartimento de células T CD8<sup>+</sup>, induzindo sinais diretos de sobrevivência e proliferação a estas células através do recetor IL-7R [423]. Já a regulação da homeostasia das células T CD4<sup>+</sup> deverá ser feita por outros mecanismos ainda não esclarecidos. Recentemente, foi proposto um modelo baseado em observações em modelos animais que identifica um interveniente celular central, as DCs plasmacitoides IL7-R $\alpha$ <sup>+</sup>, que por via de uma interação TCR-MHC classe II regulam a proliferação homeostática das células T CD4<sup>+</sup> naíves [424, 425]. Nas condições de excesso de IL-7, a expressão de MHC classe II nas pDCs IL7-R $\alpha$ <sup>+</sup> é diminuída o que reduz a capacidade destas células induzirem a proliferação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> [424]. Provavelmente, como resultado destes fatores e de uma recuperação mais lenta das pDCs [359, 426], a proliferação homeostática das células T CD4<sup>+</sup> no pós-transplante surge extremamente condicionada.

Em relação à IL-15, esta citocina é induzida pela inflamação resultante do condicionamento do transplante [373] e determina, tal anteriormente referido, a reconstituição das populações de células NK e atua muito particularmente sobre atividade replicativa e capacidade de sobrevivência das células T CD8<sup>+</sup> de memória [373, 427, 428], originando uma expansão rápida destas células.

Quanto à contribuição da proliferação celular dirigida por antigénios na recuperação inicial do compartimento linfocitário T, esta, está particularmente bem documentada para as células T CD8<sup>+</sup> reativas contra o citomegalovirus e células ativadas por microrganismos do intestino [429, 430].

As características dos compartimentos linfocitários T dos doentes em recuperação de TCE autólogos e alogénicos, observadas neste estudo, resultam destes processos. Em ambas as séries, foi observada uma desproporção esperada de células T CD8<sup>+</sup> em relação às células T CD4<sup>+</sup>. Com a caracterização do repertório estrutural do TCR das duas populações de linfócitos foi evidenciada uma restrição inicial muito pronunciada da diversidade dos repertórios clonotípicos circulantes. Na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> a distorção do repertório foi mantida sem grandes alterações durante o todo o primeiro ano de evolução. A população T CD4<sup>+</sup> apresentou um aumento da diversidade do repertório clonal, o que é indicativo de uma recuperação celular estabelecida de forma significativa a partir de novas células produzidas no timo.

A timopoiese dos doentes, ou seja, a produção de novas células T naíve, foi avaliada com a contagem de sjTRECs no sangue periférico e a frequência de células CD4<sup>+</sup> recentemente emigradas do timo (RTEs). No início da análise, os doentes de ambos os grupos apresentaram contagens residuais de sjTRECs no sangue periférico o que é indicativo de uma atividade tímica muito baixa. O compartimento de células CD4<sup>+</sup>

naíve apresentou-se severamente contraído com uma frequência de RTEs relativamente baixa.

Não surpreendentemente, a capacidade de reconstituição do compartimento de células T CD4<sup>+</sup> naíves surgiu muito condicionada pela idade dos doentes ao transplante. A dependência da atividade tímica com a idade está bem estabelecida, o timo apresenta a maior capacidade durante os primeiros 6 meses de vida e permanece com uma atividade elevada durante a infância. Na idade adulta e mais avançada, embora o timo continue a produzir células T, cada década sucessiva de idade reduz mais a ocorrência da renovação do repertório celular. Esta involução deve-se a uma redução dos tecidos corticais e medulares [431, 432], que se traduz numa limitação da produção e retardamento da exportação de células T naíves para a periferia [433-435].

Assim no grupo com transplante autólogo foram os doentes mais jovens que aos 12 meses de evolução, apresentaram as maiores contagens destas células T CD4<sup>+</sup> naíves. Interessa salientar foi observada uma correlação significativa entre a quantificação de sjTRECs aos seis meses e a dimensão da população de T CD4<sup>+</sup> naíves aos doze meses de evolução. Esta associação afigura-se útil para um reconhecimento precoce da capacidade de reconstituição imunológica e, portanto, poderá constituir um fator de avaliação laboratorial com interesse clínico.

Os doentes com transplante alogénico, apesar da menor idade relativa, apresentaram indicadores de uma atividade tímica mais condicionada e no ponto final da análise, as quantidades de células T periféricas com origem no timo é significativamente inferior aos valores normais.

Alguns estudos sobre doentes que fizeram terapias indutoras de depleção de células T (com ATG) ou doentes com infeção HIV sob terapias antirretrovirais, demonstram que mesmo em idade adulta é possível uma reconstituição relativamente célere de um repertório estrutural diverso derivado de células T naíves produzidas no timo [217, 436]. Estes resultados significam que existem no TCE fatores específicos que condicionam e retardam a regeneração tímica. Estes fatores deverão ser muito provavelmente os condicionamentos mieloablativos, que são também timo-tóxicos, a que se associam, no contexto do transplante alogénico, os regimes imunossuppressores usados para o controlo da rejeição do enxerto e profilaxia da GvHD e a própria GvHD, em particular, tal como indica a correlação obtida, nas formas mais extensas.

Foi também observado um processo de normalização qualitativa do compartimento de células T CD4<sup>+</sup> naíves em termos de frequência de RTEs. O aumento da frequência destas células é o melhor indicador da baixa atividade proliferativa induzida por

citocinas neste compartimento celular. Esta observação vai de encontro à proposta já referida de que os níveis sistémicos elevados de IL-7 inibem a expansão homeostática T CD4<sup>+</sup> naïves. Já em relação à IL-15, sabe-se também, que a que a apresentação trans desta às células T CD4<sup>+</sup> naïves constitui um mecanismo de regulação negativa natural, com o propósito de frustrar a expansão de potenciais células naïves autoreativas que escapem à tolerância central [437].

A associação destes resultados e do conhecimento atual, suporta a ideia de que a recuperação da população de células T CD4<sup>+</sup> naïves é derivada essencialmente da atividade tímica, que, portanto, importa preservar procurando regimes de condicionamento e manutenção do transplante com uma timo-toxicidade mínima. Por outro lado, alguns estudos experimentais e ensaios clínicos, têm vindo a avaliar a utilização de fatores modeladores da regeneração do timo (fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e a IL-7) de forma a obter uma renovação rápida do compartimento T CD4<sup>+</sup> após o TCE [438-442].

Nos transplantes alogénicos é possível fazer um seguimento detalhado da função do enxerto definindo a origem genotípica das diferentes linhagens celulares hematopoiéticas. Uma característica fundamental da recuperação do compartimento linfocitário T total (linfócitos CD3<sup>+</sup>), é o facto de numa fase inicial, ser normalmente estabelecida a partir de uma fração significativa de células autólogas em conjunto com células alogénicas. As segundas vão progressivamente dominando, diminuindo o quimerismo misto, à medida que se estabelecem os processos de renovação celular. Esta evolução traduz essencialmente o processo dinâmico de recuperação das contagens celulares da população de células T maioritária durante a reconstituição, as células T CD8<sup>+</sup>.

A análise da população de células T CD8<sup>+</sup> naïves indicou que esta foi a população de células deste compartimento que apresentou a maior contração inicial, no entanto, ambos os grupos de doentes demonstraram uma recuperação destas células para níveis comparáveis aos normais a partir dos 6 meses de evolução. Os doentes mais novos da população com transplante autólogo demonstraram uma melhor capacidade de recuperação destas células, mas os principais indicadores da atividade tímica, os níveis de sjTRECs já não apresentam correlação significativa com a recuperação. Estes indicadores evidenciam que as vias independentes do timo constituem o mecanismo principal para a recuperação das contagens e manutenção das proporções destas células no pós-transplante.

Os compartimentos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em recuperação foram também avaliados em relação à expressão de marcadores de competência e de ativação. Foi primeiro analisada a frequência de células com expressão de CD28, um recetor do co-

estímulo pelo B7 das APCs e células B essencial à ativação das células T mediada pelo TCR [443]. O CD28 é expresso em condições normais por cerca de 80 a 100% das células T CD4<sup>+</sup> e 55 a 85% das CD8<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico. A frequência de células T CD4<sup>+</sup> com expressão de CD28, apresentou-se nos dois grupos de doentes em níveis normais em todos os tempos da análise, o que significa que durante este processo, não há um aumento de células T CD4<sup>+</sup> potencialmente anérgicas devido à impossibilidade de recepção do co-estímulo de ativação. No compartimento T CD8<sup>+</sup> verificou-se um aumento da frequência de células CD28<sup>-</sup> mantida nos dois grupos de doentes durante todo o período da análise. Alguns estudos verificaram que as células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> apresentam telômeros mais curtos que as CD28<sup>+</sup>, o que sugere, que são células que fizeram ou resultam de vários ciclos proliferativos [444, 445], suportando portanto a noção de que são células derivadas de linfopoiese extra-tímica [446]. Estas células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> têm sido propostas como constituindo um estado celular terminalmente diferenciado e associadas com a senescência, que não são passíveis de reativação e que facilmente são induzidas em apoptose [447, 448].

Verificou-se ainda nas duas séries de doentes um aumento da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com expressão de HLA-DR. No entanto, as duas populações celulares apresentaram dinâmicas diferentes em relação à expressão deste marcador. A frequência de células CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> diminuiu progressivamente até atingir valores normais aos 12 meses. Já a fração células CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> apresentou-se significativamente expandida nos vários pontos da análise. Foi observada uma tendência de normalização, mais evidente nos doentes com autoTCE, mas aos 12 meses de evolução cerca de 45-50% das células CD8<sup>+</sup> eram HLA-DR<sup>+</sup> em ambos os grupos de doentes. O HLA-DR, e outras moléculas MHC classe II, são normalmente expressas pelas células T ativadas via TCR, devido à ação de um fator nuclear (o transativador classe II, CIITA) induzido por citocinas inflamatórias [449]. Tem sido discutida a atividade do MHC classe II nas células T ativadas e embora esta não esteja completamente esclarecida, tem sido proposto que servem simultaneamente de sistema de apresentação de Ags e que podem traduzir outros sinais modeladores das funções das células T [449-451]. Ainda assim, a expressão de HLA-DR pelas células T é correlacionada principalmente com uma tendência apoptótica e anergia, características da senescência celular [452]. Provavelmente, a dinâmica observada deve-se à progressiva renovação de um compartimento de células CD4<sup>+</sup> inicialmente alvo de ativação pelo ambiente inflamatório do peri-transplante, por novas células derivadas do desenvolvimento tímico. Por outro lado, a via dominante da recuperação celular do compartimento T CD8<sup>+</sup> não é a renovação, mas a proliferação expansiva de

células pré-existentes, o que mantém elevada a frequência de células com os fenótipos senescentes.

Foi observada também a evolução dinâmica das subpopulações celulares com fenótipo de memória dos dois compartimentos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Foram avaliadas populações celulares com fenótipos representativos dos três principais subtipos de células de memórias, as células de memória central T<sub>CM</sub>, de memória efetora T<sub>EM</sub> e de memória efetora terminalmente diferenciadas T<sub>EMRA</sub>. A sensibilidade de cada uma destas células às citocinas homeostáticas em particular à IL-15 difere. A expressão, por exemplo, do recetor IL-2/15Rβ é baixa nas células naíves e aumenta progressivamente nas células de memória T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub> até atingir o nível máximo nas T<sub>EMRA</sub> [453]. Desta forma, há uma evolução diferencial populações celulares com fenótipo de memória em ambos os compartimentos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

A população T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de ambos os grupos de doentes apresentou uma contração durante todo o primeiro ano de evolução dos transplantes sem alterações significativas das contagens celulares entre os pontos de análise. As populações CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> e T<sub>EMRA</sub> do grupo de doentes com transplante autólogo apresentaram contagens celulares normais em todos os pontos da análise. As contagens destas populações celulares nos doentes com transplante alogénico foram mais baixas e também apresentaram alterações significativas durante o tempo da análise. Do ponto de vista qualitativo, o compartimento T CD4<sup>+</sup> é profundamente marcado pela depleção de células naíves e conseqüentemente as frequências das células de memória apresentam-se desproporcionadas. Durante o processo de reconstituição, este compartimento é constituído maioritariamente por células de memória T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub>, sendo esta última a população, que tal como esperado devido à maior sensibilidade à IL-15, apresentou a maior expansão, relativamente às frequências celulares normais.

Quanto ao compartimento celular T CD8<sup>+</sup> os doentes de ambos os grupos apresentaram contagens normais das populações T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub> e T<sub>EMRA</sub> desde a avaliação aos 3 meses. Mas em termos qualitativos, a diversidade do repertório estrutural das células T CD8<sup>+</sup>, caracterizou-se pela ausência de várias famílias de segmentos *TRVB* e uma frequência muito elevada de clonotipos celulares específicos, detetados como expansões oligoclonais e mesmo monoclonais.

Em relação aos fatores clínicos relacionados com a recuperação de células T, verificou-se uma tendência para uma maior suscetibilidade às infeções nos doentes com níveis inferiores de células T<sub>EMRA</sub>. Verificou-se ainda que, utilização de ciclosporina no protocolo terapêutico dos aloTCE surgiu associado a uma diminuição das células de memória, quando comparado com o protocolo que usou o FK506. Já o GvHD nas formas mais extensas parece afetar de forma significativa a atividade tímica

baixando nos doentes afetados os níveis de sTREC, RTEs e células T CD4<sup>+</sup> naíves. Em conclusão, a reconstituição linfocitária T após o TCE é um processo prolongado, estabelecido inicialmente a partir de uma proliferação de células maduras sensíveis aos níveis elevados de citocinas homeostáticas. Este processo, a que são particularmente sensíveis as células T CD8<sup>+</sup>, tem duas consequências principais:

- as células sensíveis sofrem múltiplas divisões acabando por adquirir fenótipos senescentes com capacidade de ativação celular diminuídas,
- o repertório estrutural neste período apresenta uma diversidade clonal restrita o que compromete a capacidade imunológica dos doentes.

Nestas condições, os doentes apresentam uma suscetibilidade elevada a infeções e a recidivas tumorais. Por outro lado, a quebra da homeostase destes compartimentos linfocitários, potencia fenómenos de autoimunidade e no contexto alogénico, o desenvolvimento de GvHD. A atenuação destas complicações é estabelecida pela renovação celular derivada da atividade tímica, comprometida com os regimes timotóxicos do transplante, que lentamente reconstitui a diversidade estrutural dos repertórios celulares T naíves, efetores e reguladores.

### **5.6. Perspetivas Futuras**

Este trabalho focou-se especificamente na análise da regeneração das diferentes populações celulares hematopoiéticas com atividade imunológica e na reconstituição dos respetivos repertórios estruturais; integrando e relacionando os processos observados, com os mecanismos intrínsecos do desenvolvimento hematopoiético e imunológico e os fatores clínicos do transplante.

Uma primeira hipótese de trabalho futuro, que resulta diretamente desta análise, será uma avaliação dos efeitos e consequências da capacidade de reconstituição hematoimunológica na sobrevida após o transplante. As duas séries de doentes apresentam atualmente um tempo de evolução dos transplantes relativamente longo (de 20 meses até 5 anos). Com este período é possível categorizar vários fatores de morbilidade relacionados com o transplante como o tempo livre de doença, a incidência de doença tumoral secundária, a incidência de infeções ou a mortalidade relacionada com o transplante. Estes fatores poderão ser relacionados com a dinâmica e os perfis da reconstituição dos diferentes compartimentos celulares da resposta imunológica, estratificando fatores de risco.

Uma segunda área de trabalho, com recursos disponíveis de imediato, corresponde a uma avaliação retrospectiva ou prospetiva da diversidade imunogenética do sistema de recetores KIR na atividade GvT mediada por células NK. Este efeito parece ser

dirigido predominantemente, senão mesmo exclusivamente, contra células leucémicas da linhagem mieloide pelo que implica uma seleção de doentes com leucemia mieloide aguda e crónica com transplante alogénico. Poderá ser avaliada a correlação entre as combinações de genes KIR do par dador/recetor com o tempo livre de doença. Com base na distribuição da frequência destes genes, poderão ser avaliados critérios de seleção de dadores, que combinando os genótipos HLA e KIR, possam contribuir para um aumento do sucesso clínico destes transplantes.

Em relação à recuperação do compartimento linfocitário B, surge durante um período relativamente prolongado um aumento enorme das subpopulações imaturas transicionais. Tendo em consideração que algumas destas células apresentam ainda um potencial autoreativo que poderá ser relevante na etiopatogenia da GvHDc seria importante avaliar repertório estrutural e o histórico de divisões celulares específico destas células nestes doentes.

O ambiente linfopénico resultante do transplante apresenta condições únicas para introduzir e estabelecer imunoterapias antitumorais, o que tem sido explorado com as infusões de linfócitos após transplante. A descrição, descrição recente de uma nova população de células T de memória, as células T estaminais de memória, traz novas oportunidades de estudo e desenvolvimento dirigidas à modelação da reconstituição do compartimento linfocitário T. As células T de memória apresentam um potencial aloreativo menor que as células naíves e efetoras, mas mantêm um potencial antitumoral e de controlo de infeções elevado [292, 454]. As células T<sub>SCM</sub> apresentam capacidades importantes que as distinguem de outras populações, têm capacidade de autorrenovação e multipotência características das células estaminais, mas são Ag experientes e a sua ativação resulta numa diferenciação em células de memória central e de memória efetora [231, 232]. Estas capacidades podem fazer uma diferença importante na formação de um repertório celular T antitumoral específico que não adquira tão facilmente as características senescentes identificadas neste trabalho. Desta forma, será importante estabelecer a caracterização deste compartimento celular em relação a fenótipos diferenciadores, o potencial de proliferação e ativação, a resposta a citocinas homeostáticas e finalmente estabelecer o seu potencial aloreativo.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Iwasaki H, Suda T: **Hematopoietic Stem Cells and Their Niche**. In *Hematopoietic Stem Cell Biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009:37–55.
2. Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U: **The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view**. *Genes Dev* 2007, **21**:3044–3060.
3. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T: **Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche**. *Cell* 2004, **118**:149–161.
4. Li L, Bhatia R: **Stem cell quiescence**. *Clin Cancer Res* 2011, **17**:4936–4941.
5. Domen J, Wagers A, Weissman IL: **2. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells**. *Regenerative medicine* 2006.
6. Smith A: **A glossary for stem-cell biology**. *Nature* 2006, **441**:1060–1060.
7. Rossant J: **Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst**. *Reproduction, Fertility and Development* 2006, **19**:111–118.
8. Shostak S: **(Re)defining stem cells**. *Bioessays* 2006, **28**:301–308.
9. Ogawa M: **Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells**. *Blood* 1993, **81**:2844–2853.
10. Orkin SH: **Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages**. *Nat Rev Genet* 2000, **1**:57–64.
11. Orkin SH, Zon LI: **Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology**. *Cell* 2008, **132**:631–644.
12. Wang LD, Wagers AJ: **Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**:643–655.
13. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G: **A common precursor for hematopoietic and endothelial cells**. *Development* 1998, **125**:725–732.
14. de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E: **Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo**. *EMBO J* 2000, **19**:2465–2474.
15. Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin SH, Mikkola H: **The placenta is a niche for hematopoietic stem cells**. *Dev Cell* 2005.
16. Delassus S, Cumano A: **Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo**. *Immunity* 1996, **4**:97–106.
17. Potocnik AJ, Brakebusch C, Fässler R: **Fetal and adult hematopoietic stem cells require  $\beta 1$  integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow**. *Immunity* 2000.
18. Mikkola HKA, Orkin SH: **The journey of developing hematopoietic stem cells**. *Development* 2006, **133**:3733–3744.
19. Campagnoli C, Fisk N, Overton T, Bennett P, Watts T, Roberts I: **Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood**. *Blood* 2000, **95**:1967–1972.
20. **Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow**. *Blood* 2001, **98**:2396–2402.
21. Fruehauf S, Zeller WJ, Calandra G: *Novel Developments in Stem Cell Mobilization*. Springer; 2012.
22. Jude CD, Gaudet JJ, Speck NA, Ernst P: **Leukemia and hematopoietic stem cells: balancing proliferation and quiescence**. *Cell Cycle* 2008, **7**:586–591.
23. Enver T, Heyworth CM, Dexter TM: **Do stem cells play dice?** *Blood* 1998, **92**:348–51–

discussion 352.

24. Ogawa M: **Stochastic model revisited.** *Int J Hematol* 1999, **69**:2–5.
25. Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Macdonald HR, Trumpp A: **Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1106**:64–75.
26. Ehninger A, Trumpp A: **The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in.** *J Exp Med* 2011, **208**:421–428.
27. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS: **Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche.** *Journal of Experimental Medicine* 2011, **208**:261–271.
28. Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC: **Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice.** *Journal of Experimental Medicine* 2011, **208**:251–260.
29. Gertz MAM: **Current status of stem cell mobilization.** *Br J Haematol* 2010, **150**:647–662.
30. Till JE, McCulloch EA: **A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961.** *Radiat Res* 2011, **175**:145–149.
31. Wu AM, Siminovitch L, Till JE: **Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture. 1968.**
32. Wang JCY, Doedens M, Dick JE: **Primitive Human Hematopoietic Cells Are Enriched in Cord Blood Compared With Adult Bone Marrow or Mobilized Peripheral Blood as Measured by the Quantitative In Vivo SCID-Repopulating Cell Assay.** *Blood* 1997, **89**:3919–3924.
33. Verfaillie C, Blakolmer K, McGlave P: **Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma.** *Journal of Experimental Medicine* 1990, **172**:509–502.
34. Uchida N, Weissman IL: **Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1<sup>lo</sup> Lin- Sca-1<sup>+</sup> cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow.** *J Exp Med* 1992, **175**:175–184.
35. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Péault B: **Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992, **89**:2804–2808.
36. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH: **Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells.** *J Immunol* 1984, **133**:157–165.
37. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM: **Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> progenitor cells.** *Blood* 1991.
38. Moore T, Huang S, Terstappen LW, Bennett M, Kumar V: **Expression of CD43 on murine and human pluripotent hematopoietic stem cells.** *The Journal of Immunology* 1994, **153**:4978–4987.
39. Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin II: **Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures.** *Blood* 2006, **108**:2095–2105.
40. Lansdorp PM, Sutherland HJ, Eaves CJ: **Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34<sup>+</sup> hemopoietic cells from human bone marrow.** *Journal of Experimental Medicine* 1990, **172**:363–366.
41. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE: **Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment.** *Science* 2011,

333:218–221.

42. Hill B, Rozler E, Travis M, Chen S, Zannettino A, Simmons P, Galy A, Chen B, Hoffman R: **High-level expression of a novel epitope of CD59 identifies a subset of CD34+ bone marrow cells highly enriched for pluripotent stem cells.** *Experimental Hematology* 1996, **24**:936–943.

43. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Carotenuto M: **Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34+ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study.** 1998, **83**:587–592.

44. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K: **A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning.** ... 1997.

45. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW: **AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.** *Blood* 1997, **90**:5002–5012.

46. Uchida N, Yang Z, Combs J, Pourquié O, Nguyen M, Ramanathan R, Fu J, Welply A, Chen S, Weddell G, Sharma AK, Leiby KR, Karagogeos D, Hill B, Humeau L, Stallcup WB, Hoffman R, Tsukamoto AS, Gearing DP, Péault B: **The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells.** *Blood* 1997, **89**:2706–2716.

47. **Mini-review: Hematopoietic stem and progenitor cells.** [[http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/F/B/7/E/9/MR019HematopoiesisOnline\\_29784WEB.pdf](http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/F/B/7/E/9/MR019HematopoiesisOnline_29784WEB.pdf)]

48. Kondo M, Weissman IL, Akashi K: **Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.** *Cell* 1997, **91**:661–672.

49. Ceredig R, Rolink AG, Brown G: **Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees.** *Nature Reviews Immunology* 2009, **9**:293–300.

50. Brown G, Ceredig R: *Lineage Determination in Haematopoiesis: Quo Vadis?* Trends in immunology; 2009.

51. Kawamoto H, Katsura Y: **A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy.** *Trends Immunol* 2009, **30**:193–200.

52. Dorshkind K: **Not a split decision for human hematopoiesis.** *Nature Immunology* 2010, **11**:569–570.

53. Kawamoto H, Wada H, Katsura Y: **A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model.** *International Immunology* 2010, **22**:65–70.

54. Pronk C, Rossi DJ, Månsson R, Attema JL: **Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy.** *Cell Stem Cell* 2007.

55. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE: **Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development.** *Nature Immunology* 2010, **11**:585–593.

56. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL: **BIOLOGY OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND PROGENITORS: Implications for Clinical Application.** <http://dxdoi.org/101146/annurevimmunol21120601141007> 2003, **21**:759–806.

57. Dzierzak E, Philipsen S: **Erythropoiesis: Development and Differentiation.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013, **3**:a011601–a011601.

58. Borregaard N: **Neutrophils, from Marrow to Microbes.** *Immunity* 2010, **33**:657–670.

59. Pillay J, Braber den I, Vriskoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JAM, Tesselaar K, Koenderman L: **In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days.** *Blood* 2010, **116**:625–627.

60. Phillipson MM, Kubes PP: **The neutrophil in vascular inflammation.** *Nat Med* 2011, **17**:1381–1390.
61. **Chapter 11 Phagocytes in immunity and inflammation.** In *Principles of Medical Biology. Volume 6.* Elsevier; 1996:197–229.
62. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F: **Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells.** *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:669–692.
63. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K: **Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells.** *Science* 2010, **327**:656.
64. Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL: **Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1->3)-beta-D-glucans.** *J Leukoc Biol* 2002, **72**:140–146.
65. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG: **Monocyte-mediated defense against microbial pathogens.** *Annu Rev Immunol* 2008, **26**:421–452.
66. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW: **Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood.** *Blood* 1989, **74**:2527–2534.
67. Lawrence TT, Natoli GG: **Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity.** *Nature Reviews Immunology* 2011, **11**:750–761.
68. Quinn JM, Gillespie MT: **Modulation of osteoclast formation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **328**:739–745.
69. McCusker K, Hoidal J: **Characterization of scavenger receptor activity in resident human lung macrophages.** *Exp Lung Res* 1989, **15**:651–661.
70. Prinz M, Priller J: **Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease.** *Nature Reviews Neuroscience* 2014, **15**:300–312.
71. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA: **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice III. Functional properties in vivo.** *Journal of Experimental Medicine* 1974, **139**:1431–1445.
72. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A: **The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting.** *Annu Rev Immunol* 2013, **31**:563–604.
73. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB: **Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.** *Blood* 2010, **116**:e74–80.
74. Collin M, McGovern N, Haniffa M: **Human dendritic cell subsets.** *Immunology* 2013, **140**:22–30.
75. Morelli AE, Rubin JP, Erdos G, Tkacheva OA, Mathers AR, Zahorchak AF, Thomson AW, Falo LD, Larregina AT: **CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells.** *J Immunol* 2005, **175**:7905–7915.
76. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, Wasan PS, Wang X-N, Malinarich F, Malleret B, Larbi A, Tan P, Zhao H, Poidinger M, Pagan S, Cookson S, Dickinson R, Dimmick I, Jarrett RF, Renia L, Tam J, Song C, Connolly J, Chan JK, Gehring A, Bertoletti A, Collin M, Ginhoux F: **Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells.** *Immunity* 2012, **37**:60–73.
77. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S: **Cross-presentation by dendritic cells.** *Nature Reviews Immunology* 2012, **12**:557–569.
78. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martínez D, Hernanz-Falcón P, Rosewell I, Sousa CRE: **Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity.** *Nature* 2009, **458**:899–903.

79. Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen J-L, Keller AM, Joffre O, Zelenay S, Nye E, Le Moine A, Faure F, Donckier V, Sancho D, Cerundolo V, Bonnet D, Sousa CRE: **Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells.** *J Exp Med* 2010, **207**:1261–1271.
80. Colonna M, Trinchieri G, Liu Y-J: **Plasmacytoid dendritic cells in immunity.** *Nature Immunology* 2004, **5**:1219–1226.
81. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V: **Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions.** *Annu Rev Immunol* 2011, **29**:163–183.
82. Spits HH, Artis DD, Colonna MM, Diefenbach AA, Di Santo JPJ, Eberl GG, Koyasu SS, Locksley RMR, McKenzie ANJA, Mebius RER, Powrie FF, Vivier EE: **Innate lymphoid cells - a proposal for uniform nomenclature.** *Nature Reviews Immunology* 2013, **13**:145–149.
83. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA: **Location and cellular stages of natural killer cell development.** *Trends Immunol* 2013, **34**:573–582.
84. Spits HH, Cupedo TT: **Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function.** *Immunology* 2012, **30**:647–675.
85. Walker JA, Barlow JL, McKenzie ANJ: **Innate lymphoid cells--how did we miss them?** *Nature Reviews Immunology* 2013, **13**:75–87.
86. Roda JM, Parihar R, Magro C, Nuovo GJ, Tridandapani S, Carson WE: **Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells.** *Cancer Res* 2006, **66**:517–526.
87. Ikawa T, Fujimoto S, Kawamoto H, Katsura Y, Yokota Y: **Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:5164–5169.
88. Becknell B, Caligiuri MA: **Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells.** *Adv Immunol* 2005, **86**:209–239.
89. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park I-K, Liu S, McClory S, Marcucci G, Trotta R, Caligiuri MA: **CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets.** *Blood* 2010, **115**:274–281.
90. Caligiuri MA: **Human natural killer cells.** *Blood* 2008, **112**:461–469.
91. Cooper MA: **Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset.** *Blood* 2001, **97**:3146–3151.
92. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J: **CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset.** *Immunology* 2009, **126**:458–465.
93. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, Angeline O'Shea M, Kinter A, Kovacs C, Moretta A, Fauci AS: **Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals.** *Volume 102*; 2005:2886–2891.
94. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA: **The biology of human natural killer-cell subsets.** *Trends Immunol* 2001, **22**:633–640.
95. Bjorkstrom NK, Ljunggren HG, Sandberg JK: **CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease.** *Trends Immunol* 2010.
96. Gonzalez VD, Falconer K, Björkström NK, Blom KG, Weiland O, Ljunggren HG, Alaeus A, Sandberg JK: **Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment.** *The Journal of Immunology* 2009, **183**:6612–6618.
97. Merlin Luetke-Eversloh MKCR: **Signatures of Human NK Cell Development and Terminal Differentiation.** *Front Immun* 2013, **4**:499.
98. Zhang M, Srivastava G, Lu L: **The pre-B cell receptor and its function during B cell development.** *Cell Mol Immunol* 2004, **1**:89–94.
99. Nagasawa T: **Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell**

- development.** *Nature Reviews Immunology* 2006, **6**:107–116.
100. LeBien TW: **Fates of human B-cell precursors.** *Blood* 2000.
101. Fuxa M, Skok JA: **Transcriptional regulation in early B cell development.** *Current Opinion in Immunology* 2007, **19**:129–136.
102. Nutt SL, Kee BL: **The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment.** *Immunity* 2007, **26**:715–725.
103. Mandel EM, Grosschedl R: **Transcription control of early B cell differentiation.** *Current Opinion in Immunology* 2010, **22**:161–167.
104. Chen X, Jensen P: **The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells.** *Arch Immunol Ther Exp* 2008, **56**:77–83.
105. Yuseff M-I, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Duménil A-M: **How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity.** *Nature Reviews Immunology* 2013, **13**:475–486.
106. Karasuyama H, Rolink A, Melchers F: **Surrogate Light Chain in B Cell Development.** In *Advances in Immunology. Volume Volume 63.* Edited by Dixon FJ. Academic Press; 1996:1–41 T2 -. [Advances in Immunology]
107. Herzog S, Reth M, Jumaa H: **Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling.** *Nature Reviews Immunology* 2009, **9**:195–205.
108. Nemazee DA, Burki K: **Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes.** *Nature* 1989, **337**:562–566.
109. Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie TB, Smith-Gill SJ, Brink RA, Pritchard-Briscoe H, Wotherspoon JS, Loblay RH, Raphael K: **Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice.** *Nature* 1988, **334**:676–682.
110. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D: **Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells.** *The Journal of Experimental Medicine.* 1993. **177**: 1009-1020. *J Immunol* 2011, **186**:1313–1324.
111. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M: **Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance.** *The Journal of Experimental Medicine.* 1993. **177**: 999-1008. *J Immunol* 2011, **186**:1303–1312.
112. Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw PJ, Gibson J, Williams A, Tangye SG: **Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells.** *Blood* 2010, **115**:519–529.
113. Rothenberg EV, Taghon T: **Molecular genetics of T cell development.** *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:601–649.
114. Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K: **Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation.** *Advances in ...* 2008.
115. Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K-I, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Holländer GA, Shima DT, Habu S: **Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development.** *J Exp Med* 2008, **205**:2507–2513.
116. Rothenberg EV, Zhang J, Li L: **Multilayered specification of the T-cell lineage fate.** *Immunol Rev* 2010, **238**:150–168.
117. Girardi M: **Immunosurveillance and Immunoregulation by  $\gamma\delta$  T Cells.** *Journal of Investigative Dermatology* 2006, **126**:25–31.
118. Miyazaki K, Miyazaki M, Murre C: **The establishment of B versus T cell identity.** *Trends Immunol* 2014, **35**:205–210.
119. Germain RN: **T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision.** *Nature Reviews Immunology* 2002, **2**:309–322.
120. Li J, Iwanami N, Hoa VQ, Furutani-Seiki M, Takahama Y: **Noninvasive intravital**

- imaging of thymocyte dynamics in medaka.** *J Immunol* 2007, **179**:1605–1615.
121. Allen PM: **Peptides in positive and negative selection: a delicate balance.** *Cell* 1994, **76**:593–596.
122. Boehmer von H: **Positive selection of lymphocytes.** *Cell* 1994, **76**:219–228.
123. Boehmer von H, Teh HS, Kisielow P: **The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful.** *Immunology Today* 1989, **10**:57–61.
124. Singer A, Adoro S, Park JH: **Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4-versus CD8-lineage choice.** *Nature Reviews Immunology* 2008.
125. Egerton M, Scollay R, Shortman K: **Kinetics of mature T-cell development in the thymus.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**:2579–2582.
126. Takahama Y: **Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection.** *Nature Reviews Immunology* 2006, **6**:127–135.
127. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L: **Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self.** *Nature Immunology* 2001, **2**:1032–1039.
128. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC: **Aire regulates negative selection of organ-specific T cells.** *Nature Immunology* 2003, **4**:350–354.
129. Werdelin O, Cordes U, Jensen T: **Aberrant expression of tissue-specific proteins in the thymus: a hypothesis for the development of central tolerance.** *Scand J Immunol* 1998, **47**:95–100.
130. Gray D, Abramson J, Benoist C, Mathis D: **Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire.** *J Exp Med* 2007, **204**:2521–2528.
131. Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH, Andrian von UH: **Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus.** *Nature Immunology* 2006, **7**:1092–1100.
132. Gavin M: **Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells.** *Current Opinion in Immunology* 2003, **15**:690–696.
133. Watanabe N, Wang Y-H, Lee HK, Ito T, Wang YH, Wang Y-H, Cao W, Liu Y-J: **Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus.** *Nature* 2005, **436**:1181–1185.
134. Hsieh CS, Rudensky AY: **The Role of TCR Specificity in Naturally Arising CD25+ CD4+ Regulatory T Cell Biology.** In *CD4+CD25+ Regulatory T Cells: Origin, Function and Therapeutic Potential. Volume 293.* Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005:25–42. [Current Topics in Microbiology and Immunology]
135. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL: **Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3.** *Immunity* 2005.
136. Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW: **The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense\*.** *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2006, **7**:277–300.
137. Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D: **Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells.** *Front Immunol* 2013, **4**.
138. Lanier LL: **NK cell receptors.** *Annu Rev Immunol* 1998, **16**:359–393.
139. Wu JJ, Song YY, Bakker ABA, Bauer SS, Spies TT, Lanier LL, Phillips JHJ: **An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.** *Science* 1999, **285**:730–732.
140. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ: **HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.** *Nature* 1998, **391**:795–799.

141. Borrego FF, Masilamani MM, Marusina AIA, Tang XX, Coligan JEJ: **The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance.** *Immunol Res* 2006, **35**:263–278.
142. Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O: **Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection.** *Trends Immunol* 2013, **34**:182–191.
143. Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS: **Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein.** *J Immunol* 2005, **174**:3859–3863.
144. Carrington M, Martin MP: **The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, **298**:225–257.
145. Ruggeri LL, Capanni MM, Casucci MM, Volpi II, Tosti AA, Perruccio KK, Urbani EE, Negrin RSR, Martelli MFM, Velardi AA: **Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation.** *Blood* 1999, **94**:333–339.
146. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA: **Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect.** *Blood* 2002, **100**:1935–1947.
147. Hsu, Dupont: **Natural killer cell receptors: Regulating innate immune responses to hematologic malignancy.** *Semin Hematol* 2005, **42**:13–13.
148. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, Trowsdale J: **Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:4778–4783.
149. Pyo C-W, Guethlein LA, Vu Q, Wang R, Abi-Rached L, Norman PJ, Marsh SGE, Miller JS, Parham P, Geraghty DE: **Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus.** *PLoS ONE* 2010, **5**:e151115–e151115.
150. Moesta AK, Parham P: **Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3.** *Front Immun* 2012, **3**:336–336.
151. Sternberg-Simon M, Brodin P, Pickman Y, Onfelt B, Kärre K, Malmberg K-J, Höglund P, Mehr R: **Natural killer cell inhibitory receptor expression in humans and mice: a closer look.** *Front Immun* 2013, **4**:65–65.
152. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan OC, Dekker CL, Mackey S, Maecker H, Swan GE, Davis MM, Norman PJ, Guethlein LA, Desai M, Parham P, Blish CA: **Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry.** *Sci Transl Med* 2013, **5**:208ra145–208ra145.
153. Chan H-W, Miller JS, Moore MB, Lutz CT: **Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles.** *J Immunol* 2005, **175**:5966–5974.
154. Davies GE, Locke SM, Wright PW, Li H, Hanson RJ, Miller JS, Anderson SK: **Identification of bidirectional promoters in the human KIR genes.** *Genes Immun* 2007, **8**:245–253.
155. Stulberg MJ, Wright PW, Dang H, Hanson RJ, Miller JS, Anderson SK: **Identification of distal KIR promoters and transcripts.** *Genes Immun* 2007, **8**:124–130.
156. Li H, Pascal V, Martin MP, Carrington M, Anderson SK: **Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression.** *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000254–e1000254.
157. Cooley S, Xiao F, Pitt M, Gleason M, McCullar V, Bergemann TL, McQueen KL, Guethlein LA, Parham P, Miller JS: **A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature.** *Blood* 2007, **110**:578–586.
158. Grzywacz B, Kataria N, Sikora M, Oostendorp RA, Dzierzak EA, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR: **Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and**

- functional properties by developing human natural killer cells.** *Blood* 2006, **108**:3824–3833.
159. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetyncck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E: **Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I.** *Immunity* 2006, **25**:331–342.
160. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg K-J, Michaëlsson J: **Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors.** *Blood* 2010, **115**:1166–1174.
161. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, Lopez-Vergès S, Lanier LL, Weisdorf D, Miller JS: **Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function.** *Blood* 2012, **119**:2665–2674.
162. Béziat V, Dalgard O, Asselah T, Halfon P, Bedossa P, Boudifa A, Hervier B, Theodorou I, Martinot M, Debre P, Björkström NK, Malmberg K-J, Marcellin P, Vieillard V: **CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients.** *Eur J Immunol* 2012, **42**:447–457.
163. Giudicelli V, Lefranc M-P: **IMGT-Ontology 2012.** *Front Genet* 2012, **3**:1–16.
164. Lefranc MP: **Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes.** *Exp Clin Immunogenet* 2001, **18**:100–116.
165. Giudicelli V, Lefranc M-P: **IMGT-ONTOLOGY 2012.** *Front Genet* 2012, **3**:79–79.
166. Tonegawa S: **Somatic generation of immune diversity.** *Biosci Rep* 1988, **8**:3–26.
167. Ehlich A: **Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development.** *Cell* 1993, **72**:695–704.
168. Bassing CH, Swat W, Alt FW: **The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination.** *Cell* 2002, **109**:S45–S55.
169. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, Alt FW: **Mechanism and control of V (D) J recombination versus class switch recombination: similarities and differences.** *Adv Immunol* 2005, **86**:43–112.
170. Bräuninger A, Goossens T, Rajewsky K, Küppers R: **Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human.** *Eur J Immunol* 2001, **31**:3631–3637.
171. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Sharrow SO, Goldman CK, Leder P, Waldmann TA: **Normal human B cells display ordered light chain gene rearrangements and deletions.** *J Exp Med* 1982, **156**:975–985.
172. van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, Barendregt BH, de Haas EFE, Reinders MJT, Lankester AC, Révész T, Staal FJT, van Dongen JJM: **Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression.** *J Immunol* 2005, **175**:5912–5922.
173. Hiom K, Gellert M: **A Stable RAG1–RAG2–DNA Complex That Is Active in V(D)J Cleavage.** *Cell* 1997, **88**:65–72.
174. Hiom K, Gellert M: **Assembly of a 12/23 Paired Signal Complex: A Critical Control Point in V(D)J Recombination.** *Molecular Cell* 1998, **1**:1011–1019.
175. McBlane J, van Gent DC, Ramsden DA, Romeo C, Cuomo CA, Gellert M, Oettinger MA: **Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps.** *Cell* 1994, **83**:387–395.
176. van Zelm MC, van der Burg M, Langerak AW, van Dongen JJM: **PID Comes Full Circle: Applications of V(D)J Recombination Excision Circles in Research, Diagnostics and Newborn Screening of Primary Immunodeficiency Disorders.** *Primary Immunodeficiencies* 2011, **2**.
177. van Zelm MC, Berkowska MA, van der Burg M, van Dongen JJM: **Real-time**

- quantitative (RQ-)PCR approach to quantify the contribution of proliferation to B lymphocyte homeostasis.** *Methods Mol Biol* 2013, **979**:133–145.
178. Gottlieb TM, Jackson SP: **The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen.** *Cell* 1993, **72**:131–142.
179. Grawunder U, Harfst E: **How to make ends meet in V(D)J recombination.** *Current Opinion in Immunology* 2001, **13**:186–194.
180. Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay J-P: **Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency.** *Cell* 2001, **105**:177–186.
181. Schlissel MS: **Structure of nonhairpin coding-end DNA breaks in cells undergoing V(D)J recombination.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:2029–2037.
182. Benedict CL, Gilfillan S, Thai TH, Kearney JF: **Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development.** *Immunol Rev* 2000, **175**:150–157.
183. Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP: **Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV.** *Current Biology* 1997, **7**:588–598.
184. Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP: **XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining.** *Cell* 2006, **124**:301–313.
185. Chung JB, Silverman M, Monroe JG: **Transitional B cells: step by step towards immune competence.** *Trends Immunol* 2003, **24**:342–348.
186. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, Contentin N, Tilly H, Tron F, Vannier J-P, Jacquot S: **Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation.** *Clinical Immunology* 2008, **127**:14–25.
187. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, Looney RJ, Sanz I, Anolik JH: **Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy.** *The Journal of Immunology* 2009, **182**:5982–5993.
188. Hoek KL, Antony P, Lowe J, Shinnars N, Sarmah B, Wente SR, Wang D, Gerstein RM, Khan WN: **Transitional B cell fate is associated with developmental stage-specific regulation of diacylglycerol and calcium signaling upon B cell receptor engagement.** *J Immunol* 2006, **177**:5405–5413.
189. Cancro MP: **Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis.** *Immunol Rev* 2004, **197**:89–101.
190. Cerutti A, Cols M, Puga I: **Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes.** *Nature Reviews Immunology* 2013, **13**:118–132.
191. Klein U, Dalla-Favera R: **Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy.** *Nature Reviews Immunology* 2008, **8**:22–33.
192. Mebius RE, Kraal G: **Structure and function of the spleen.** *Nature Reviews Immunology* 2005, **5**:606–616.
193. Pillai S, Cariappa A, Moran ST: **Marginal zone B cells.** *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:161–196.
194. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L: **B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen.** *Immunology* 2012.
195. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R: **Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production.** *J Exp Med* 2000, **192**:1545–1552.
196. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR: **Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity.** *Nature Reviews Immunology* 2005, **5**:853–865.
197. McHeyzer-Williams LJ, Pelletier N, Mark L, Fazilleau N, McHeyzer-Williams MG:

- Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity.** *Current Opinion in Immunology* 2009, **21**:266–273.
198. Tellier J, Nutt SL: **The unique features of follicular T cell subsets.** *Cell Mol Life Sci* 2013, **70**:4771–4784.
199. Di Noia JM, Neuberger MS: **Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation.** *Annu Rev Biochem* 2007, **76**:1–22.
200. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE: **Mechanism and regulation of class switch recombination.** *Annu Rev Immunol* 2008, **26**:261–292.
201. Chaudhuri J, Alt FW: **Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair.** *Nature Reviews Immunology* 2004, **4**:541–552.
202. Shikh EI MEM, Pitzalis C: **Follicular dendritic cells in health and disease.** *Antigen Presenting Cell Biology* 2012, **3**.
203. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A: **CD27: a memory B-cell marker.** *Immunology Today* 2000, **21**:204–206.
204. Good-Jacobson KL, Tarlinton DM: **Multiple routes to B-cell memory.** *International Immunology* 2012, **24**:403–408.
205. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova J-L, Reynaud C-A, Weill J-C: **Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire.** *Blood* 2004, **104**:3647–3654.
206. Berkowska MA, Driessen GJA, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, He B, Biermann K, Lange JF, van der Burg M, van Dongen JJM, van Zelm MC: **Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways.** *Blood* 2011, **118**:2150–2158.
207. Tangye SG, Good KL: **Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or “memory” B cells?** *J Immunol* 2007, **179**:13–19.
208. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJM: **Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion.** *Journal of Experimental Medicine* 2007, **204**:645–655.
209. Ochsenbein AFA, Pinschewer DDD, Siervo SS, Horvath EE, Hengartner HH, Zinkernagel RMR: **Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:13263–13268.
210. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, Bret C, Duperray C, Hose D, Klein B: **An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization.** *Blood* 2009, **114**:5173–5181.
211. Kunkel EJ, Butcher EC: **Plasma-cell homing.** *Nature Reviews Immunology* 2003, **3**:822–829.
212. Shapiro-Shelef M, Calame K: **Regulation of plasma-cell development.** *Nature Reviews Immunology* 2005, **5**:230–242.
213. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S: **The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy.** ... 2006.
214. Lefranc MP: **Nomenclature of the human T cell receptor genes.** *Curr Protoc Immunol* 2001, **Appendix 10.1**.
215. Mackelprang R, Carlson CS, Subrahmanyam L, Livingston RJ, Eberle MA, Nickerson DA: **Sequence variation in the human T-cell receptor loci.** *Immunol Rev* 2002, **190**:26–39.
216. Lefranc MP, Lefranc G: *The T Cell Receptor FactsBook.* Elsevier Science; 2001.

217. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA: **Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection.** *Nature* 1998, **396**:690–695.
218. Lorenzi AR, Patterson AM, Pratt A, Jefferson M, Chapman CE, Ponchel F, Isaacs JD: **Determination of thymic function directly from peripheral blood: A validated modification to an established method.** *J Immunol Methods* 2008, **339**:185–194.
219. Yao XS, Diao Y, Sun WB, Luo JM, Qin M, Tang XY: **Analysis of the CDR3 length repertoire and the diversity of TCR alpha chain in human peripheral blood T lymphocytes.** *Cell Mol Immunol* 2007, **4**:215–220.
220. Demeure CE, Byun DG, Yang LP, Vezzio N, Delespesse G: **CD31 (PECAM-1) is a differentiation antigen lost during human CD4 T-cell maturation into Th1 or Th2 effector cells.** *Immunology* 1996, **88**:110–115.
221. Hassan J, Reen DJ: **Human Recent Thymic Emigrants-Identification, Expansion, And Survival Characteristics.** *J Immunol* 2001, **167**:1970–1976.
222. Russ BE, Prier JE, Rao S, Turner SJ: **T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation.** *Epigenomics and Epigenetics* 2013, **4**.
223. Wan YY, Flavell RA: **How Diverse--CD4 Effector T Cells and their Functions.** *Journal of Molecular Cell Biology* 2009, **1**:20–36.
224. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E: **The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets.** *Eur J Immunol* 2013, **43**:2797–2809.
225. Seder RA, Ahmed R: **Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation.** *Nature Immunology* 2003, **4**:835–842.
226. Pepper M, Jenkins MK: **Origins of CD4+ effector and central memory T cells.** *Nature Immunology* 2011, **12**:467–471.
227. MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P: **Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment.** *Immunology* 2010, **130**:10–15.
228. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP: **A human memory T cell subset with stem cell-like properties.** *Nat Med* 2011, **17**:1290–1297.
229. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A: **Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.** *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:745–763.
230. Flynn JK, Gorry PR: **Stem memory T cells (TSCM)-their role in cancer and HIV immunotherapies.** *Clin Transl Immunology* 2014, **3**:e20–e20.
231. Gattinoni L, Zhong X-S, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, Wrzesinski C, Boni A, Cassard L, Garvin LM, Paulos CM, Muranski P, Restifo NP: **Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells.** *Nat Med* 2009, **15**:808–813.
232. Gattinoni L, Restifo NP: **Moving T memory stem cells to the clinic.** *Blood* 2013, **121**:567–568.
233. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M: **CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs.** *Cell* 1999, **99**:23–33.
234. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR: **Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses.** *Immunology Today* 1998, **19**:568–574.
235. Wherry EJ, Ahmed R: **Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection.** *J Virol* 2004, **78**:5535–5545.
236. Zhang N, Bevan MJ: **CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System.** *Immunity* 2011, **35**:161–168.

237. Joshi NS, Kaech SM: **Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation.** *J Immunol* 2008, **180**:1309–1315.
238. Harty JT, Badovinac VP: **Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory.** *Nature Reviews Immunology* 2008, **8**:107–119.
239. Kaech SM, Cui W: **Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation.** *Nature Reviews Immunology* 2012, **12**:749–761.
240. Parish IA, Kaech SM: **Diversity in CD8(+) T cell differentiation.** *Current Opinion in Immunology* 2009, **21**:291–297.
241. Kaech SM, Wherry EJ: **Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+T Cell Differentiation during Viral Infection.** *Immunity* 2007, **27**:393–405.
242. Wilson CB, Rowell E, Sekimata M: **Epigenetic control of T-helper-cell differentiation.** *Nature Reviews Immunology* 2009, **9**:91–105.
243. Gray SM, Kaech SM, Staron MM: **The interface between transcriptional and epigenetic control of effector and memory CD8(+) T-cell differentiation.** *Immunol Rev* 2014, **261**:157–168.
244. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, Eden W: **T cell subsets and T cell-mediated immunity.** In *Principles of Immunopharmacology*. Basel: Birkhäuser Basel; 2011:15–27.
245. R E Hardy EVI: **Bone marrow transplantation: a review.** *Journal of the National Medical Association* 1989, **81**:518–523.
246. Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A, Szer J, Lipton J, Schwendener A, Gratwohl M, Frauendorfer K, Niederwieser D, Horowitz M, Kodera Y, Blood FTWNO, Transplantation M: **Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Global Perspective.** *JAMA* 2010, **303**:1617–1624.
247. Couban S, Barnett M: **The source of cells for allografting.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2003, **9**:669–673.
248. Schmitz N, Barrett J: **Optimizing engraftment--source and dose of stem cells.** *Semin Hematol* 2002, **39**:3–14.
249. Laughlin MJ: **Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults.** *Bone Marrow Transplantation* 2001, **27**:1–6.
250. Bishop MR: *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Springer; 2009.
251. **CHAPTER 2 - Essential biology of stem cell transplantation.** Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009:9–21.
252. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA: **Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**:3828–3832.
253. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM: **Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation.** ... 2000.
254. Gyger M, Stuart RK, Perreault C: **Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor.** *Bone Marrow Transplantation* 2000, **26**:1–16.
255. De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Bernier M, Massy M, Stryckmans P, Ley P, De Hemptinne D: **Comparison of the coexpression of cd38, cd33 and hla-dr antigens on cd34+ purified cells from human cord blood and bone marrow.** *STEM CELLS* 1995, **13**:281–288.
256. Steen R, Tjonnfjord GE, Egeland T: **Comparison of the phenotype and clonogenicity of normal CD34+ cells from umbilical cord blood, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and adult human bone marrow.** *J Hematother* 1994, **3**:253–262.
257. Risdon G, Gaddy J, Stehman FB, Broxmeyer HE: **Proliferative and Cytotoxic Responses of Human Cord Blood T Lymphocytes Following Allogeneic Stimulation.**

*Cell Immunol* 1993, **154**:14–24.

258. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirel T, Sanders J, Storb R, Buckner CD: **Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor.** *Blood* 1995, **85**:1655–1658.

259. Körbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giral S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB: **Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts.** *Blood* 1995, **85**:1659–1665.

260. Schmitz N, Dreger P, Suttrop M, Rohwedder EB, Haferlach T, Löffler H, Hunter A, Russell NH: **Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor).** *Blood* 1995, **85**:1666–1672.

261. Cho SHS, Chung IJI, Lee JJJ, Park MLM, Kim HJH: **Comparison of CD34+ subsets and clonogenicity in human bone marrow, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and cord blood.** *J Korean Med Sci* 1999, **14**:520–525.

262. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ, (null): **Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** *Annu Rev Immunol* 2007, **25**:139–170.

263. **The EBMT Handbook ~ Haematopoietic Stem Cell Transplantation - The EBMT Handbook ~ Haematopoietic Stem Cell Transplantation** [<http://ebmtonline.forumservice.net/media/08/main.html>]

264. Gyurkocza B, Sandmaier BM: **Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all.** *Blood* 2014, **124**:344–353.

265. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R: **Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts.** *N Engl J Med* 1979, **300**:1068–1073.

266. Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, Witherspoon RP, Fefer A, Fisher L, Buckner CD, Anasetti C, Appelbaum FR, Badger C: **Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia.** *Blood* 1989, **73**:1720–1728.

267. Cooke KR, Coghill JM, Hildebrandt GC, Serody JS: **CH 17 - Chemokines and graft-versus-host disease.** In *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Edited by Socié G, Blazar BR. San Diego: Academic Press; 2013:393–424.

268. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS Jr.: **Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect.** *Stem Cells Dev* 2009, **18**:683–692.

269. Lapidot T, Petit I: **Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.** *Experimental Hematology* 2002, **30**:973–981.

270. Lapidot T, Dar A, Kollet O: **How do stem cells find their way home?** *Blood* 2005, **106**:1901–1910.

271. Spitzer TR: **Engraftment syndrome following hematopoietic stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplantation* 2001, **27**:893–898.

272. Maiolino A, Biasoli I, Lima J, Portugal AC, Pulcheri W, Nucci M: **Engraftment syndrome following autologous hematopoietic stem cell transplantation: definition of diagnostic criteria.** *Bone Marrow Transplantation* 2003, **31**:393–397.

273. Edenfield WJ, Moores LK, Goodwin G, Lee N: **An engraftment syndrome in autologous stem cell transplantation related to mononuclear cell dose.** *Bone Marrow Transplantation* 2000, **25**:405–409.

274. Cottler-Fox M, Montgomery M, Theus J: **CHAPTER 24 - Collection and processing of marrow and blood hematopoietic stem cells.** In *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice*. Edited by Treleaven J. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009:249–256.

275. Copelan EA: **Hematopoietic Stem-Cell Transplantation.** *N Engl J Med* 2006, **354**:1813–1826.
276. Charron D, Petersdorf E: **CH 2 - The HLA system in hematopoietic stem cell transplantation.** In *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.* Edited by Socié G, Blazar BR. San Diego: Academic Press; 2013:19–38.
277. Marsh SGE, Parham P, Barber LD: *The HLA FactsBook.* Academic Press; 1999.
278. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Ochoa FS, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI: **A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells.** *The Journal of Immunology* 2004, **173**:4828–4837.
279. Hambach L, Spierings E, Goulmy E: **Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Minor histocompatibility antigens.** *Best Pract Res Clin Haematol* 2007, **20**:171–187.
280. Velardi A, Ruggeri L, Alessandro, Moretta, Moretta L: **NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation.** *Trends Immunol* 2002, **23**:438–444.
281. Ruggeri LL, Zhang SS, Farag SSS: **Natural killer cell activity and killer immunoglobulin-like receptors in hematopoietic stem cell transplantation.** *Cancer Treat Res* 2009, **144**:47–69.
282. Foley B, Felices M, Cichocki F, Cooley S, Verneris MR, Miller JS: **The biology of NK cells and their receptors affects clinical outcomes after hematopoietic cell transplantation (HCT).** *Immunol Rev* 2014, **258**:45–63.
283. Giralto SS, Bishop MRM: **Principles and overview of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Cancer Treat Res* 2009, **144**:1–21.
284. Focosi D, Zucca A, Scatena F: **The Role of Anti-HLA Antibodies in Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2011, **17**:1585–1588.
285. Barrett AJ: **CHAPTER 2 - Essential biology of stem cell transplantation.** In *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice.* Edited by Treleaven J. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009:9–21.
286. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M, Paul M, Raanani P, Shpilberg O: **Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis.** *Bone Marrow Transplantation* 2009, **43**:643–653.
287. Cutler C, Antin JH: **Novel drugs for the prevention and treatment of acute GVHD.** *Curr Pharm Des* 2008, **14**:1962–1973.
288. Inamoto Y, Flowers MED: **Treatment of chronic graft-versus-host disease in 2011.** *Current Opinion in Hematology* 2011, **18**:414–420.
289. Nguyen VH, Zeiser R, Negrin RS: **Role of Naturally Arising Regulatory T Cells in Hematopoietic Cell Transplantation.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2006, **12**:995–1009.
290. Le Blanc K, Ringden O: **Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience.** *J Intern Med* 2007, **262**:509–525.
291. Michael M, Shimoni A, Nagler A: **Regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation.** *Clin Dev Immunol* 2013, **2013**:608951.
292. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M: **Advances in graft-versus-host disease biology and therapy.** *Nature Reviews Immunology* 2012, **12**:443–458.
293. Martin PJ, Pavletic SZ: **Biology and management of chronic graft-versus-host disease.** *Cancer Treat Res* 2009, **144**:277–298.
294. Vincent K, Roy D-C, Perreault C: **Next-generation leukemia immunotherapy.** *Blood* 2011, **118**:2951–2959.
295. Horowitz MMM, Gale RPR, Sondel PMP, Goldman JMJ, Kersey JJ, Kolb HJH, Rimm AAA, Ringden OO, Rozman CC, Speck BB: **Graft-versus-leukemia reactions after bone**

marrow transplantation. *Blood* 1990, **75**:555–562.

296. Matte-Martone C, Liu J, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD: **CD8+ but not CD4+ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4+ and CD8+ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL.** *Blood* 2008, **111**:3884–3892.

297. Van Driessche A, Gao L, Stauss HJ, Ponsaerts P, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI: **Antigen-specific cellular immunotherapy of leukemia.** *Leukemia* 2005, **19**:1863–1871.

298. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, Stern M, Pende D, Perruccio K, Burchielli E, Topini F, Bianchi E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A: **Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value.** *Blood* 2007, **110**:433–440.

299. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS: **Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation.** *Curr Opin Oncol* 2010, **22**:130–137.

300. McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P: **Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation.** *Hum Immunol* 2007, **68**:309–323.

301. Stringaris K, Adams S, Uribe M, Eniafe R, Wu CO, Savani BN, Barrett AJ: **Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 Are Associated with a Reduced Rate of Leukemia Relapse After HLA-Identical Sibling Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia but Not Other Hematologic Malignancies.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2010, **16**:1257–1264.

302. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, Marsh SGE, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Weisdorf DJ: **Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia.** *Blood* 2009, **113**:726–732.

303. Hollingsworth CL, Frush DP, Kurtzburg J, Prasad VK: **Pediatric hematopoietic stem cell transplantation and the role of imaging.** *Radiology* 2008, **248**:348–365.

304. Sottini A, Ghidini C, Zanotti C, Chiarini M, Caimi L, Lanfranchi A, Moratto D, Porta F, Imberti L: **Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation.** *Clinical Immunology* 2010, **136**:11–11.

305. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, Berenson JR, Collins RH, Koup RA: **Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stemcell transplantation and prediction of T-cell reconstitution.** *The Lancet* 2000, **355**:1875–1881.

306. Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, Caimi L, Imberti L: **Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies.** *J Transl Med* 2013, **11**:119.

307. Chen X, Barfield R, Benaim E, Leung W, Knowles J, Lawrence D, Otto M, Shurtleff SA, Neale GAM, Behm FG, Turner V, Handgretinger R: **Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients.** *Blood* 2005, **105**:886–893.

308. van Zelm MC, Szczepański T, van der Burg M, van Dongen JJM: **Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion.** *J Exp Med* 2007, **204**:645–655.

309. Pannetier C, Even J, Kourilsky P: **T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples.** *Immunology Today* 1995, **16**:176–181.

310. Puisieux I, Even J, Pannetier C, Jotereau F, Favrot M, Kourilsky P: **Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas.** *J Immunol* 1994, **153**:2807–2818.

311. Currier JR, Deulofeut H, Barron KS, Kehn PJ, Robinson MA: **Mitogens, superantigens, and nominal antigens elicit distinctive patterns of TCRB CDR3 diversity.** *Hum Immunol* 1996, **48**:39–51.
312. Choi YW, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J: **Interaction of Staphylococcus aureus toxin “superantigens” with human T cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**:8941–8945.
313. Even J, Lim A, Puisieux I, Ferradini L, Dietrich PY, Toubert A, Hercend T, Triebel F, Pannetier C, Kourilsky P: **T-cell repertoires in healthy and diseased human tissues analysed by T-cell receptor  $\beta$ -chain CDR3 size determination: evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases.** *Research in Immunology* 1995, **146**:65–80.
314. Wahlström J, Gigliotti D, Roquet A, Wigzell H, Eklund A, Grunewald J: **T cell receptor Vbeta expression in patients with allergic asthma before and after repeated low-dose allergen inhalation.** *Clinical Immunology* 2001, **100**:31–39.
315. **IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R)** [<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/31/1/307>]
316. Brochet X, Lefranc M-P, Giudicelli V: **IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis.** *Nucleic Acids Research* 2008, **36**(Web Server issue):W503–W508.
317. Gorski JJ, Yassai MM, Zhu XX, Kissela BB, Kissela BBK BCT, Keever CC, Flomenberg NN: **Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status.** *J Immunol* 1994, **152**:5109–5119.
318. Sloand EM, Mainwaring L, Fuhrer M, Ramkissoon S, Risitano AM, Keyvanafar K, Lu J, Basu A, Barrett AJ, Young NS: **Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome.** *Blood* 2005, **106**:841–851.
319. Wu CJ, Chillemi A, Alyea EP, Orsini E, Neuberg D, Soiffer RJ, Ritz J: **Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism.** *Blood* 2000, **95**:352–359.
320. Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R: **Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire.** *Mol Immunol* 1992, **29**:193–203.
321. Gokmen E, Raaphorst FM, Boldt DH, Teale JM: **Ig heavy chain third complementarity determining regions (H CDR3s) after stem cell transplantation do not resemble the developing human fetal H CDR3s in size distribution and Ig gene utilization.** *Blood* 1998, **92**:2802–2814.
322. Omazic B, Lundkvist I, Mattsson J, Permert J, Nasman-Bjork I: **Memory B lymphocytes determine repertoire oligoclonality early after haematopoietic stem cell transplantation.** *Clin Exp Immunol* 2003, **134**:159–166.
323. Chen X, Knowles J, Barfield RC, Kasow KA, Madden R, Woodard P, Srivastava DK, Horwitz EM, Handgretinger R, Hale GA: **A novel approach for quantification of KIR expression in healthy donors and pediatric recipients of hematopoietic SCTs.** *Bone Marrow Transplantation* 2008, **43**:525–532.
324. Nunes JM, Buhler S, Roessli D, Sanchez Mazas A: **The HLA-net GENE[RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas.** *Tissue Antigens* 2014, **83**:307–323.
325. Nunes JM: **Using UNIFORMAT and GENE[RATE] to analyse data with ambiguities in population genetics.** 2014.
326. Gonzalez-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, Kempson F, Maia MHT, Silva ALS, Silva ALTE, Ghataoraya GS, Alfirevic A, Jones AR, Middleton D: **Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse**

- drug reaction associations.** *Nucleic Acids Research* 2014, **43**:D784–D788.
327. Augusto DG, Piovezan BZ, Tsuneto LT, Callegari-Jacques SM, Petzl-Erler ML: **KIR Gene Content in Amerindians Indicates Influence of Demographic Factors.** *PLoS ONE* 2013, **8**:e56755.
328. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, Marsh SGE, Geraghty D, Spellman S, Haagenson MD, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P, Miller JS: **Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia.** *Blood* 2010, **116**:2411–2419.
329. O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM: **Functional Polymorphism of the KIR3DL1/S1 Receptor on Human NK Cells.** *J Immunol* 2006, **178**:235–241.
330. Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A: **HLA class I supertypes: a revised and updated classification.** *BMC Immunol* 2008, **9**:1.
331. Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N, Yawata M, Easterbrook P, McVicar DW, Maenaka K, Parham P, Carrington M, Dong T, Rowland-Jones S: **Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B.** *J Immunol* 2007, **178**:33–37.
332. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Marsh SGE, Spellman S, Haagenson MD, Saetern K, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P, Miller JS: **Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia.** *J Immunol* 2014, **192**:4592–4600.
333. Venstrom JM, Gooley TA, Spellman S, Pring J, Malkki M, Dupont B, Petersdorf E, Hsu KC: **Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Blood* 2010, **115**:3162–3165.
334. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, Gallagher MM, Malkki M, Petersdorf E, Dupont B, Hsu KC: **HLA-C-Dependent Prevention of Leukemia Relapse by Donor Activating KIR2DS1.** *N Engl J Med* 2012, **367**:805–816.
335. Martin MP, Gao X, Lee J-H, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M: **Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS.** *Nat Genet* 2002, **31**:429–434.
336. Ault KA: **Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation.** *Journal of Experimental Medicine* 1985, **161**:1483–1502.
337. Antin JH, Ault KA, Rapoport JM, Smith BR: **B lymphocyte reconstitution after human bone marrow transplantation. Leu-1 antigen defines a distinct population of B lymphocytes.** *J Clin Invest* 1987, **80**:325–332.
338. **Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-.** 2011, **208**:67–80.
339. Griffin DO, Rothstein TL: **Human B1 Cell Frequency: Isolation and Analysis of Human B1 Cells.** *Front Immun* 2012, **3**.
340. Covens K, Verbinen B, Geukens N, Meyts I, Schuit F, Van Lommel L, Jacquemin M, Bossuyt X: **Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype.** *Blood* 2013, **121**:5176–5183.
341. Fumoux F, Guigou V, Blaise D, Maraninchi D, Fougereau M, Schiff C: **Reconstitution of human immunoglobulin VH repertoire after bone marrow transplantation mimics B-cell ontogeny.** *Blood* 1993, **81**:3153–3157.
342. Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dörner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE: **Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells.** *J Clin Invest* 1997, **99**:2488–2501.
343. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Bhuiya NS, Cutler CS, Soiffer RJ, Antin JH,

- Ritz J: **High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:6107–6114.
344. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Cutler CS, Bhuiya NS, Schowalter M, Ho VT, Alyea EP, Koreth J, Blazar BR, Soiffer RJ, Antin JH, Ritz J: **Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease.** *Blood* 2009, **113**:3865–3874.
345. Kuzmina Z, Greinix HT, Weigl R, Körmöczi U, Rottal A, Frantal S, Eder S, Pickl WF: **Significant differences in B-cell subpopulations characterize patients with chronic graft-versus-host disease-associated dysgammaglobulinemia.** *Blood* 2011, **117**:2265–2274.
346. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Möwes B, Radbruch A, Thiel A: **Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood.** *J Exp Med* 2002, **195**:789–794.
347. Bishop MR: *Hematopoietic Stem Cell Transplantation.* Springer; 2009.
348. Apperley J: *The EBMT Handbook. Haemopoietic Stem Cell Transplantation.* 2008.
349. Son MH, Kim DH, Lee SH, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Kim JY, Cho EJ, Kang ES, Kim DW: **Hematologic Recovery after Tandem High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplantation in Children with High-Risk Solid Tumors.** *J Korean Med Sci* 2013, **28**:220–226.
350. Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Logan BR, Leitman SF, Anderlini P, Klein JP, Horowitz MM, Miller JP, King RJ, Confer DL: **Donor, recipient, and transplant characteristics as risk factors after unrelated donor PBSC transplantation: beneficial effects of higher CD34+ cell dose.** *Blood* 2009, **114**:2606–2616.
351. Kałwak K, Porwolik J, Mielcarek M, Gorczyńska E, Owoc-Lempach J, Ussowicz M, Dyla A, Musiał J, Paździor D, Turkiewicz D, Chybicka A: **Higher CD34+and CD3+Cell Doses in the Graft Promote Long-Term Survival, and Have No Impact on the Incidence of Severe Acute or Chronic Graft-versus-Host Disease after In Vivo T Cell-Depleted Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2010, **16**:1388–1401.
352. Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socié G, Espérou H, Devergie A, Cortivo LD, Marolleau J-P, Garnier F, Ribaud P, Gluckman E: **Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation.** *Blood* 2002, **99**:2726–2733.
353. Davies SM, Kollman C, Anasetti C, Antin JH, Gajewski J, Casper JT, Nademanee A, Noreen H, King R, Confer D, Kernan NA: **Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the national marrow donor program.** *Blood* 2000, **96**:4096–4102.
354. Ali MY, Oyama Y, Monreal J, Winter J, Tallman M, Gordon LI, WILLIAMS S, Singhal S, Mehta J: **Reassessing the definition of myeloid engraftment after autotransplantation: it is not necessary to see  $0.5 \times 10^9/l$  neutrophils on 3 consecutive days to define myeloid recovery.** *Bone Marrow Transplantation* 2002, **30**:749–752.
355. Mounier N, Larghero J, Manson J, Brice P, Madelaine-Chambrin I, Brière J, Ertault M, Hennequin C, Miclea J-M, Benbunan M, Marolleau J-P, Gisselbrecht C: **Long term hematologic recovery after autologous stem cell transplantation in lymphoma patients: impact of the number of prefreeze and post-thaw CD34+ cells.** *Bulletin du Cancer* 2005, **92**:10031–10038.
356. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH: **Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis.** *JCO* 2001, **19**:3685–3691.
357. Remberger M, Beelen DW, Fauser A, Basara N, Basu O, Ringdén O: **Increased risk of extensive chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using unrelated donors.** *Blood* 2005, **105**:548–551.
358. Carral A, la Rubia de J, Martín G, Martínez J, Sanz G, Jarque I, Sempere A, Soler MA,

- Marty ML, Sanz MA: **Factors influencing hematopoietic recovery after autologous blood stem cell transplantation in patients with acute myeloblastic leukemia and with non-myeloid malignancies.** *Bone Marrow Transplantation* 2002, **29**:825–832.
359. Fagnoni FF, Oliviero B, Giorgiani G, De Stefano P, Dehò A, Zibera C, Gibelli N, Maccario R, Da Prada G, Zecca M, Locatelli F: **Reconstitution dynamics of plasmacytoid and myeloid dendritic cell precursors after allogeneic myeloablative hematopoietic stem cell transplantation.** *Blood* 2004, **104**:281–289.
360. Elze MC, Ciocarlie O, Heinze A, Kloess S, Gardlowski T, Esser R, Klingebiel T, Bader P, Huenecke S, Serban M, Köhl U, Hutton JL: **Dendritic cell reconstitution is associated with relapse-free survival and acute GVHD severity in children after allogeneic stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplantation* 2015, **50**:266–273.
361. Giraud S, Dhedin N, Gary-Gouy H, Lebon P, Vernant J-P, Dalloul A: **Plasmacytoid dendritic cell reconstitution following bone marrow transplantation: subnormal recovery and functional deficit of IFN-alpha/beta produ... - PubMed - NCBI.** *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2005, **25**:135–143.
362. Farag SS, Caligiuri MA: **Human natural killer cell development and biology.** *Blood Rev* 2006, **20**:123–137.
363. Chouaib S, Pittari G, Nanbakhsh A, Ayoubi El H, Amsellem S, Bourhis J-H, Spanholtz J: **Improving the Outcome of Leukemia by Natural Killer Cell-Based Immunotherapeutic Strategies.** *Front Immun* 2014, **5**.
364. Parham P, McQueen KL: **Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants.** *Nature Reviews Immunology* 2003, **3**:108–122.
365. Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S: **Clinical Relevance of Natural Killer Cells Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** *J Cancer*, **4**:25–35.
366. Béziat V, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadière B, Debre P, Vieillard V: **CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation.** *The Journal of Immunology* 2011, **186**:6753–6761.
367. Ferlazzo G, Münz C: **NK cell compartments and their activation by dendritic cells.** *J Immunol* 2004, **172**:1333–1339.
368. Nguyen S, Kuentz M, Vernant JP, Dhedin N, Bories D, Debre P, Vieillard V: **Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation.** *Leukemia* 2008, **22**:344–352.
369. Cooley S, McCullar V, Wangen R, Bergemann TL, Spellman S, Weisdorf DJ, Miller JS: **KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation.** *Blood* 2005, **106**:4370–4376.
370. Nguyen S, Dhedin N, Vernant J-P, Kuentz M, Jijakli AI A, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Boudifa A, Debre P, Vieillard V: **NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect.** *Blood* 2005, **105**:4135–4142.
371. Dulphy N, Haas P, Busson M, Belhadj S, de Latour RP, Robin M, Carmagnat M, Loiseau P, Tamouza R, Scieux C, Rabian C, Di Santo JP, Charron D, Janin A, Socié G, Toubert A: **An Unusual CD56brightCD16low NK Cell Subset Dominates the Early Posttransplant Period following HLA-Matched Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** *J Immunol* 2008, **181**:2227–2237.
372. Cui G, Hara T, Simmons S, Wagatsuma K, Abe A, Miyachi H, Kitano S, Ishii M, Tani-ichi S, Ikuta K: **Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014, **111**:1915–1920.
373. Williams KM, Hakim FT, Gress RE: **T cell immune reconstitution following lymphodepletion.** *Seminars in Immunology* 2007, **19**:318–330.
374. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A: **Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells.** *J Exp Med* 2001, **194**:1711–1719.

375. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F: **Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines.** *Blood* 2003, **101**:4260–4266.
376. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA: **CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell–derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity.** *Blood* 2003, **101**:3052–3057.
377. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD: **Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells.** *J Exp Med* 2002, **195**:1523–1532.
378. Ferlazzo G: **Natural killer and dendritic cell liaison: Recent insights and open questions.** *Immunology Letters* 2005, **101**:12–17.
379. Morandi B, Mortara L, Carrega P, Cantoni C, Costa G, Accolla RS, Mingari MC, Ferrini S, Moretta L, Ferlazzo G: **NK cells provide helper signal for CD8+ T cells by inducing the expression of membrane-bound IL-15 on DCs.** *International Immunology* 2009, **21**:599–606.
380. Chijioke O, Muenz C: **Dendritic Cell Derived Cytokines in Human Natural Killer Cell Differentiation and Activation.** *Front Immun* 2013, **4**.
381. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L, Münz C: **Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:16606–16611.
382. Vitale M, Chiesa Della M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, Moretta A: **The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells.** *Eur J Immunol* 2004, **34**:1715–1722.
383. Ferlazzo G, Thomas D, Lin S-L, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Münz C: **The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic.** *J Immunol* 2004, **172**:1455–1462.
384. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A: **Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants.** *Science* 2002, **295**:2097–2100.
385. Wang H, Grzywacz B, Sukovich D, McCullar V, Cao Q, Lee AB, Blazar BR, Cornfield DN, Miller JS, Verneris MR: **The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations.** *Blood* 2007, **110**:1530–1539.
386. Arnaiz-Villena A, Martínez-Laso J, Alonso-García J: **Iberia: population genetics, anthropology, and linguistics.** *Hum Biol* 1999, **71**:725–743.
387. Arredi B, Poloni ES, Paracchini S, Zerjal T, Fathallah DM, Makrelouf M, Pascali VL, Novelletto A, Tyler-Smith C: **A predominantly neolithic origin for Y-chromosomal DNA variation in North Africa.** *Am J Hum Genet* 2004, **75**:338–345.
388. Bosch E, Calafell F, Pérez-Lezaun A, Clarimón J, Comas D, Mateu E, Martínez-Arias R, Morera B, Brakez Z, Akhayat O, Sefiani A, Hariti G, Cambon-Thomsen A, Bertranpetit J: **Genetic structure of north-west Africa revealed by STR analysis.** *Eur J Hum Genet* 2000, **8**:360–366.
389. Comas D, Calafell F, Benchemsi N, Helal A, Lefranc G, Stoneking M, Batzer MA, Bertranpetit J, Sajantila A: **Alu insertion polymorphisms in NW Africa and the Iberian Peninsula: evidence for a strong genetic boundary through the Gibraltar Straits.** *Hum Genet* 2000, **107**:312–319.
390. Canossi A, Piancatelli D, Aureli A, Oumhani K, Ozzella G, Del Beato T, Liberatore G, Aouad El R, Adorno D: **Correlation between genetic HLA class I and II polymorphisms and anthropological aspects in the Chaouya population from Morocco (Arabic**

- speaking). *Tissue Antigens* 2010, **76**:177–193.
391. Hou L, Chen M, Ng J, Hurley CK: **Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry.** *Genes Immun* 2011, **13**:47–58.
392. Hollenbach JA, Meenagh A, Sleator C, Alaez C, Bengoche M, Canossi A, Contreras G, Creary L, Evseeva I, Gorodezky C, Hardie RA, Hemming Karlsen T, Lie B, Luo M, Martinetti M, Navarette C, De Oliveira DCM, Ozzella G, Pasi A, Pavlova E, Pinto S, Porto LC, Santos P, Slavcev A, Srinak D, Tavoularis S, Tonks S, Trachtenberg E, Vejbaesya S, Middleton D: **Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA.** *Tissue Antigens* 2010, **76**:9–17.
393. Linn YC, Phang CY, Lim TJ, Chong SF, Heng KK, Lee JJ, Loh Y, Hwang W, Goh YT, Koh M: **Effect of missing killer-immunoglobulin-like receptor ligand in recipients undergoing HLA full matched, non-T-depleted sibling donor transplantation: a single institution experience of 151 Asian patients.** *Bone Marrow Transplantation* 2010, **45**:1031–1037.
394. Gill S, Olson JA, Negrin RS: **Natural Killer Cells in Allogeneic Transplantation: Effect on Engraftment, Graft-versus-Tumor, and Graft-versus-Host Responses.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2009, **15**:765–776.
395. Handgretinger R: **Donor selection for AML: do the KIR.** *Blood* 2010, **116**:2407–2409.
396. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM: **Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules.** *Nature* 2005, **436**:709–713.
397. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E: **Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I.** *Immunity* 2006, **25**:331–342.
398. Yu J, Heller G, Chewning J, Kim S, Yokoyama WM, Hsu KC: **Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands.** *J Immunol* 2007, **179**:5977–5989.
399. Fischer JC, Ottinger H, Ferencik S, Sribar M, Punzel M, Beelen DW, Schwan MA, Grosse-Wilde H, Wernet P, Uhrberg M: **Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor.** *J Immunol* 2007, **178**:3918–3923.
400. Giebel S, Dziaczkowska J, Czerw T, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Nowak I, Holowiecka A, Segatti A, Kyrzcz-Krzemien S, Kusnierczyk P, Holowiecki J: **Sequential recovery of NK cell receptor repertoire after allogeneic hematopoietic SCT.** *Bone Marrow Transplantation* 2010, **45**:1022–1030.
401. Cuisinier AM, Guigou VV, Boubli LL, Fougereau MM, Tonnelle CC: **Preferential expression of VH5 and VH6 immunoglobulin genes in early human B-cell ontogeny.** *Scand J Immunol* 1989, **30**:493–497.
402. Schroeder HW: **Slow, programmed maturation of the immunoglobulin HCDR3 repertoire during the third trimester of fetal life.** *Blood* 2001, **98**:2745–2751.
403. Tchao NK, Turka LA: **Lymphodepletion and homeostatic proliferation: implications for transplantation.** *Am J Transplant* 2012, **12**:1079–1090.
404. Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE: **Identification and Characterization of a Human CD5+ Pre-Naive B Cell Population.** *The Journal of Immunology* 2009, **182**:4116–4126.
405. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T: **Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus.** *J Immunol* 2000, **165**:5970–5979.
406. Fedorow Y, Samulski TD, Deal AM, Dunphy CH, Sharf A, Shea TC, Serody JS, Sarantopoulos S: **Bone Marrow B cell Precursor Number after Allogeneic Stem Cell**

**Transplantation and GVHD Development.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2012, **18**:968–973.

407. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H: **Peripheral development of B cells in mouse and man.** *Immunol Rev* 2004, **197**:179–191.

408. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H: **Human B-1 cells take the stage.** *Ann N Y Acad Sci* 2013, **1285**:97–114.

409. Descatoire M, Weill J-C, Reynaud C-A, Weller S: **A human equivalent of mouse B-1 cells?** *Journal of Experimental Medicine* 2011, **208**:2563–2564.

410. Greinix HT, Pohlreich D, Kouba M, Körmöczy U, Lohmann I, Feldmann K, Zielinski C, Pickl WF: **Elevated Numbers of Immature/Transitional CD21<sup>-</sup> B Lymphocytes and Deficiency of Memory CD27<sup>+</sup> B Cells Identify Patients with Active Chronic Graft-versus-Host Disease.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2008, **14**:208–219.

411. McHeyzer-Williams LJ, Pelletier N, Mark L, Fazilleau N, McHeyzer-Williams MG: **Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity.** *Current Opinion in Immunology* 2009, **21**:266–273.

412. Krutzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter H-H, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R: **Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen.** *J Exp Med* 2003, **197**:939–945.

413. Avanzini MA, Locatelli F, Santos Dos C, Maccario R, Lenta E, Oliveri M, Giebel S, De Stefano P, Rossi F, Giorgiani G, Amendola G, Telli S, Marconi M: **B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27<sup>+</sup> B cells.** *Experimental Hematology* 2005, **33**:480–486.

414. Cuthbert RJ, Iqbal A, Gates A, Toghil PJ, Russell NH: **Functional hyposplenism following allogeneic bone marrow transplantation.** *J Clin Pathol* 1995, **48**:257–259.

415. Picardi M, Selleri C, Rotoli B: **Spleen sizing by ultrasound scan and risk of pneumococcal infection in patients with chronic GVHD: preliminary observations.** *Bone Marrow Transplantation* 1999, **24**:173–177.

416. Nakayama A, Hirabayashi N, Ito M, Kasai K, Fujino M, Ohbayashi M, Asai J: **White pulp reconstitution after human bone marrow transplantation.** *Am J Pathol* 1993, **143**:1111–1120.

417. Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, Oey M, Stroux A, Hemmati P, Westermann J, Blau O, Wittenbecher F, Movassaghi K, Szyska M, Thomas S, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na I-K: **Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT.** *Blood* 2014, **124**:963–972.

418. Talvensaari K: **A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation.** *Blood* 2002, **99**:1458–1464.

419. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE: **T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny.** *Blood* 1993, **82**:2585–2594.

420. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE: **Distinctions Between CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-Cell Regenerative Pathways Result in Prolonged T-Cell Subset Imbalance After Intensive Chemotherapy.** *Blood* 1997, **89**:3700–3707.

421. Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J, Steinberg SM, Wood LV, Yarchoan R, Zuckerman J, Landay A, Mackall CL: **A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis.** *Blood* 2001, **97**:2983–2990.

422. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, Surh CD: **IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:8732–8737.

423. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE: **Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application.** *Nature Reviews Immunology* 2011, **11**:330–342.
424. Guimond M, Veenstra RG, Grindler DJ, Zhang H, Cui Y, Murphy RD, Kim SY, Na R, Hennighausen L, Kurtulus S, Erman B, Matzinger P, Merchant MS, Mackall CL: **Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells.** *Nature Immunology* 2009, **10**:149–157.
425. Kaye J: **Niche marketing: regulation of the homeostasis of naive CD4+ T cells.** *Nature Immunology* 2009, **10**:136–138.
426. Elze MC, Ciocarlie O, Heinze A, Kloess S, Gardlowski T, Esser R, Klingebiel T, Bader P, Huenecke S, Serban M, Köhl U, Hutton JL: **Dendritic cell reconstitution is associated with relapse-free survival and acute GVHD severity in children after allogeneic stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplantation* 2015, **50**:266–273.
427. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A: **IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation.** *Immunity* 1998, **9**:669–676.
428. Li Y, Zhi W, Wareski P, Weng N-P: **IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8+ T cells in vitro.** *J Immunol* 2005, **174**:4019–4024.
429. Chalandon Y, Degermann S, Villard J, Arlettaz L, Kaiser L, Vischer S, Walter S, Heemskerk MHM, van Lier RAW, Helg C, Chapuis B, Roosnek E: **Pretransplantation CMV-specific T cells protect recipients of T-cell-depleted grafts against CMV-related complications.** *Blood* 2006, **107**:389–396.
430. Ganepola S, Gentilini C, Hilbers U, Lange T, Rieger K, Hofmann J, Maier M, Liebert UG, Niederwieser D, Engelmann E, Heilbronn R, Thiel E, Uharek L: **Patients at high risk for CMV infection and disease show delayed CD8+ T-cell immune recovery after allogeneic stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplantation* 2007, **39**:293–299.
431. Dion M-L, Poulin J-F, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, Dalloul A, Boulassel M-R, Debre P, Routy J-P, Grossman Z, Sékaly R-P, Cheynier R: **HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation.** *Immunity* 2004, **21**:757–768.
432. Geenen V, Poulin J-F, Dion ML, Martens H, Castermans E, I Hansenne, Moutschen M, Sékaly RP, Cheynier R: **MINI-REVIEW Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology.** *J Endocrinol* 2003, **176**:305–311.
433. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, Odom J, Vance BA, Christensen BL, Mackall CL, Gress RE: **Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults.** *J Clin Invest* 2005, **115**:930–939.
434. Lewin SR, Heller G, Zhang L, Rodrigues E, Skulsky E, van den Brink MRM, Small TN, Kernan NA, O'reilly RJ, Ho DD, Young JW: **Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations.** *Blood* 2002, **100**:2235–2242.
435. Sfikakis PP, Gourgoulis GM, Mouloupoulos LA, Kouvatseas G, Theofilopoulos AN, Dimopoulos MA: **Age-related thymic activity in adults following chemotherapy-induced lymphopenia.** *Eur J Clin Invest* 2005, **35**:380–387.
436. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, Ames S, Lerner S, Ebcioğlu Z, Nair V, Dinavahi R, Sehgal V, Heeger P, Schroppel B, Murphy B: **Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin.** *Am J Transplant* 2010, **10**:2132–2141.
437. Chen X-L, Bobbala D, Cepero Donates Y, Mayhue M, Ilangumaran S, Ramanathan S: **IL-15 trans-presentation regulates homeostasis of CD4(+) T lymphocytes.** *Cell Mol Immunol* 2014, **11**:387–397.
438. Bolotin E, Smogorzewska M, Smith S, Widmer M, Weinberg K: **Enhancement of**

- thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood* 1996, **88**:1887–1894.
439. Jin J, Goldschneider I, Lai L: **In vivo administration of the recombinant IL-7/hepatocyte growth factor  $\beta$  hybrid cytokine efficiently restores thymopoiesis and naive T cell generation in lethally irradiated mice after syngeneic bone marrow transplantation.** *The Journal of Immunology* 2011, **186**:1915–1922.
440. Alpdogan O, Hubbard VM, Smith OM, Patel N, Lu S, Goldberg GL, Gray DH, Feinman J, Kochman AA, Eng JM, Suh D, Muriglian SJ, Boyd RL, van den Brink MRM: **Keratinocyte growth factor (KGF) is required for postnatal thymic regeneration.** *Blood* 2006, **107**:2453–2460.
441. Rossi S, Blazar BR, Farrell CL, Danilenko DM, Lacey DL, Weinberg KI, Krenger W, Holländer GA: **Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease.** *Blood* 2002, **100**:682–691.
442. Rossi SW, Jeker LT, Ueno T, Kuse S, Keller MP, Zuklys S, Gudkov AV, Takahama Y, Krenger W, Blazar BR, Holländer GA: **Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells.** *Blood* 2007, **109**:3803–3811.
443. Choi B-S, Park Y-K, Lee J-S: **The CD28/HLA-DR expressions on CD4+T but not CD8+T cells are significant predictors for progression to AIDS.** *Clin Exp Immunol* 2002, **127**:137.
444. Monteiro J, Batliwalla F, Ostrer H, Gregersen PK: **Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts.** *J Immunol* 1996, **156**:3587–3590.
445. Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, Harley CB, Villeponteau B, West MD, Giorgi JV: **Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis.** *AIDS* 1996, **10**:F17–22.
446. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE: **Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy.** *Blood* 1997, **89**:3700–3707.
447. Borthwick NJ, Lowdell M, Salmon M, Akbar AN: **Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis.** *International Immunology* 2000, **12**:1005–1013.
448. Weng N-P, Akbar AN, Goronzy J: **CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function.** *Trends Immunol* 2009, **30**:306–312.
449. Holling TM, Schooten E, Langerak AW, van den Elsen PJ: **Regulation of MHC class II expression in human T-cell malignancies.** *Blood* 2004, **103**:1438–1444.
450. Kudo H, Matsuoka T, Mitsuya H, Nishimura Y, Matsushita S: **Cross-linking HLA-DR molecules on Th1 cells induces anergy in association with increased level of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1).** *Immunology Letters* 2002, **81**:149–155.
451. Di Rosa F, D'Oro U, Ruggiero G, Racioppi L, Acquaviva A, Ferrone S, Fontana S, Zappacosta S: **HLA class II molecules transduce accessory signals affecting the CD3 but not the interleukin-2 activation pathway in T blasts.** *Hum Immunol* 1993, **38**:251–260.
452. Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J, Cowan K, Gress RE: **Constraints on CD4 Recovery Postchemotherapy in Adults: Thymic Insufficiency and Apoptotic Decline of Expanded Peripheral CD4 Cells.** *Blood* 1997, **90**:3789–3798.
453. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F: **Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines.** *Blood* 2003, **101**:4260–4266.
454. Zheng H, Matte-Martone C, Li H, Anderson BE, Venketesan S, Tan HS, Jain D, McNiff J,

Shlomchik WD: **Effector memory CD4<sup>+</sup> T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease.** *Blood* 2008, **111**:2476–2484.

**Anexos:**

De acordo com o previsto no Decreto-Lei 388/70, art. 8º, parágrafo 2, os resultados apresentados neste trabalho encontram-se publicados ou estão correntemente a ser preparados como os seguintes artigos:

**D. Ligeiro**, S. Buhler, M. Abecasis, O. Abade, A. Sanchez-Mazas, M. Gomes da Silva and H. Trindade. **KIR genotypic diversity in Portuguese and analysis of KIR gene allocation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *HLA*. 2016 May;87(5):375-80. doi: 10.1111/tan.12795. Epub 2016 Apr 13.

**Dario Ligeiro**, Manuel Abecasis, Alice Lima, Olga Abade, Paula Videira, Maria Gomes da Silva and Helder Trindade. T cell levels correlate with an enhanced reconstitution of the NK cell compartment after hematopoietic stem cell transplantation. (manuscripto em preparação)

**Dario Ligeiro**, Manuel Abecasis, Alice Lima, Isabelina Ferreira, Gilda Teixeira, Nuno Miranda, Olga Abade, Carla Espadinha, Paula Videira, Maria Gomes da Silva and Helder Trindade. **B cell reconstitution after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: the dynamics and factors marking the recovery process on autologous and allogeneic transplants.** (manuscripto em preparação)



## BRIEF COMMUNICATION

# KIR genotypic diversity in Portuguese and analysis of KIR gene allocation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

D. Ligeiro<sup>1</sup>, S. Buhler<sup>2,3</sup>, M. Abecasis<sup>4</sup>, O. Abade<sup>1</sup>, A. Sanchez-Mazas<sup>2,5</sup>, M. Gomes da Silva<sup>4,6</sup> & H. Trindade<sup>1</sup>

1 Lisbon Center for Blood and Transplantation, Instituto Português de Sangue e Transplantação, Lisbon, Portugal

2 Laboratory of Anthropology, Genetics and Peopling History, Department of Genetics and Evolution-Anthropology Unit, University of Geneva, Geneva, Switzerland

3 Transplantation Immunology Unit & National Reference Laboratory for Histocompatibility, Department of Genetic and Laboratory Medicine, Geneva University Hospital, Geneva, Switzerland

4 Hematology Department, Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, EPE, Lisbon, Portugal

5 Institute of Genetics and Genomics in Geneva (IGE3), University of Geneva, Geneva, Switzerland

6 CEDOC, NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal

## Key words

hematopoietic stem cell transplantation;  
killer immunoglobulin-like receptors  
genotypic diversity; killer  
immunoglobulin-like receptors–human  
leukocyte antigen ligand interaction; natural  
killer cell alloreactivity

## Correspondence

Dario Ligeiro  
Lisbon Center for Blood and Transplantation  
IPST-IP Alameda Linhas de Torres 117  
1169-001 Lisbon  
Portugal  
Tel: 00351217504100  
Fax: 00351217504142  
e-mail: dario@ipst.min-saude.pt

Received 16 October 2015; revised 20  
January 2016; accepted 8 March 2016

doi: 10.1111/tan.12795

## Introduction

The function of mature natural killer (NK) cells is under the dominant control of a repertoire of inhibitory receptors, stochastically expressed, that comprises the variable killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) family (1). These receptors recognize specific forms of human leukocyte antigen (HLA) class I molecules as markers of self in normal cells (2) and a ligand compromised expression allows a large group of activating NK receptors and co-receptors to trigger cytolytic activity (3, 4). Several layers of complexity contribute to KIR extensive genetic and cellular diversity, including variable gene types and content, allelic polymorphism, the combination of inherited haplotypes and a variegated clonal expression (5, 6). At present, a cluster of 16 *KIR* genes have been characterized in humans, of which 8 are NK cell inhibitors (KIR2DL1–5,

## Abstract

The diversity of killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) genes was evaluated in Portuguese and the observed genotypic profiles were found related to the ones reported in European populations. The KIR repertoire after hematopoietic stem cell transplantation is determined by these gene frequencies and the KIR group B motifs are the less common. We estimated donor–KIR/recipient–ligand interactions in transplants with related donors and unrelated donors found in a local registry or from abroad. A large fraction of transplants had all three ligands of inhibitory receptors, and therefore, in theory were not prone to natural killer cell (NK) mediated alloreactivity. Furthermore, the distribution of KIR alloreactive interactions was found independent of the donor–recipient genetic proximity, probably because of different gene segregation and comparable KIR frequencies in the donor pools.

3DL1–3), 6 NK cell activators (KIR2DS1–5, 3DS1) and 2 pseudogenes (KIR2DP1, 3DP1). The genomic structure of KIR haplotypes is defined by a framework of conserved genes located at the centromeric (3DL3) and telomeric (3DL2) ends, as well as in the central part (3DP1 and 2DL4) (7). These framework genes define two regions; a centromeric, with two alternative gene-content motifs named Cen-A and Cen-B and a telomeric, also with two types of contents, named Tel-A and Tel-B. Cen-A and Tel-A combine to each other to form relatively short haplotypes named group A KIR haplotypes. All other motif combinations, i.e. Cen-B with Tel-B, Cen-B with Tel-A, and Cen-A with Tel-B are collectively called group B KIR haplotypes (8). The main distinction between group A and group B haplotypes is in the number of activator KIR genes. Group A haplotypes contain at most a single activator gene,

2DS4, whereas group B haplotypes contain various combinations of activator genes (9).

As a consequence of the key role of KIR in modulating NK cell responses, KIR diversity in human populations is associated with risk/severity or outcome of clinical conditions such as infection (10), autoimmunity (11, 12), hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (13–15) and pregnancy (16). In this study, we investigated the KIR gene cluster diversity and organization in Portuguese and compared it to that of neighboring populations. In addition, we evaluated the impact of KIR genetic diversity in the allocation of KIR gene profiles in different settings of HLA-matched allogeneic HSCT. We also established the prevalence and distribution of potential donor–KIR/recipient–ligand interactions that might favor the capture of a positive alloreactive effect mediated by NK cells and impact transplantation outcome.

After written informed consent, the DNA from 229 unrelated individuals was tested for the presence or absence of 16 KIR genes by using a RSSOP-PCR Luminex-based assay (One Lambda, Canoga Park, CA). All the studied subjects were European individuals living in Portugal and with Portuguese family names, referred either for autologous or allogeneic HSCT, or included as healthy controls in an immunological recovery study. A second dataset composed of three groups of recipient–donor's pairs with a different genetic proximity was also genotyped in order to evaluate allocated KIR gene profiles and interactions with recipient HLA class I ligands in a transplantation setting. The first group contained 111 HLA-identical related transplants, the second was made of 101 unrelated transplants with an HLA 10 of 10 allele matched donor from the Portuguese registry and the third group was composed of 102 unrelated transplants with a 10 of 10 matched donor identified in European and North American registries through Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW). Carrier frequencies (F) for each KIR gene were determined by direct counting from the first dataset. Gene frequencies ( $f_G$ ) were estimated by using an expectation-maximization (EM) algorithm implemented in the Gene[rate] tools (17, 18) that also assess the fit to Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) using a nested likelihood approach. KIR F's from neighboring populations were retrieved from the allele frequencies.net database (AFND) (19) and gene frequencies were calculated using Bernstein's formula (20). KIR genotypes and gene motifs for Cen and Tel parts of the KIR locus were inferred from individual gene content and known linkage, as previously described (8, 15). Full-length KIR haplotypes frequencies were estimated with an EM algorithm and global linkage disequilibrium (GLD) between Cen and Tel portions of the KIR gene cluster was evaluated using a likelihood ratio-test implemented in the Gene[rate] tools (17). Differences in frequencies between Portuguese from the first dataset and populations retrieved from AFND, on the one hand, and between transplant groups from the second dataset, on the other hand, were tested using Fisher's exact test, with a  $P$ -value  $<0.05$  considered significant.

The individual gene content varied from 8 to 16 KIR genes and a total of 36 different KIR genotypes were identified in the studied population. The 5 most frequent genotypes accounted for 66.8% of all observed profiles, whereas 18 genotypes (50.0% of the profiles identified) were found to be present only in a single individual. KIR gene carrier frequencies for this population were found similar to the ones described in a small Portuguese dataset ( $n=65$ ) previously submitted to AFND. The proportion of individuals carrying each KIR gene (F) and the KIR gene frequencies ( $f_G$ ) found in this study are presented in Table 1. All gene frequencies were concordant with expected HWE proportions ( $P=1$ ). As expected, the framework genes 2DL4, 3DL2, 3DL3 and 3DP1 were ubiquitous in all genotypes, but other genes such as 2DL1, 3DL1, 2DS4 and 2DP1 were also carried by more than 90.0% of the individuals. Similarly, to what is described for many other populations' worldwide, inhibitory KIR gene frequencies were generally higher than those of KIR activator genes. Indeed, inhibitory KIR gene frequencies always exceeded 0.65, except for 2DL2 (0.32) and 2DL5 (0.28), whereas activator KIR gene frequencies never reached 0.40, except for Tel-A 2DS4 (0.77). Regarding the distribution and zygosity of the two pairs of loci that behave as alleles of the same genes, i.e. 2DL2/2DL3 and 3DL1/3DS1, respectively, the most frequent genotypes found were the homozygous 2DL2–/2DL3+ (46.4%) and 3DL1+/3DS1– (66.0%). Homozygous 2DL2 and 3DS1 genotypes were found in only 11.5 and 4.6% of individuals, respectively. KIR gene diversity in Portuguese was compared with that observed in two geographically close populations, the Spanish and the Western Moroccans. There have been continuous interactions between Portuguese and Spanish populations throughout history (21), whereas the population from West Morocco has remained more isolated, as confirmed by low levels of genetic diversity suggesting rapid genetic drift and the Gibraltar Strait acting as geographic barrier to gene flow (22–24), although not for all genetic markers (25). Also, gene flow from French, Spaniards and Portuguese populations has been described (26). The frequency distribution of KIR genes found in Portuguese was very similar to that observed in Spanish (no significant differences at any locus,  $P>0.05$ ), whereas gene frequencies differed significantly between Portuguese and Moroccans at several loci (3DL3, 2DL2, 2DL3, 2DL5 and 2DS3, Table 1). Notably, the distribution of 2DL2/2DL3 in Moroccans is more balanced than in Portuguese (0.45 and 0.48 versus 0.32 and 0.66, respectively), while 2DL5 and 2DS3 frequencies were significantly higher in the former (0.43 versus 0.28 and 0.31 versus 0.16, respectively). However, these differences only remained significant at loci 2DL3 and 2DS3 after correction for multiple testing.

The KIR genotypic and haplotypic structural diversity in Portuguese is detailed in Table 2. In what concerns the centromeric KIR region, the Cen-A/B genotype was found with the highest frequency (48.1%), followed by Cen-A/A (40.4%) and Cen-B/B (11.5%). Other studies (15, 27) have found a similar distribution of KIR Cen genotypes, although in the current

**Table 1** Carriers (F) and gene ( $f_G$ ) frequencies of inhibitory, activator and pseudogene KIR in populations from Portugal, Spain and Morocco

KIR	Portuguese (n = 229)		Spanish (n = 131)			Moroccan (n = 67)		
	F (%)	$f_G^a$	F (%)	$f_G^b$	$P^c$	F (%)	$f_G^b$	$P^c$
Pseudogenes and framework genes								
2DP1	95.3	0.79	93.1	0.74	ns	100	1	ns
3DP1	100	1	100	1	ns	100	1	ns
2DL4	100	1	100	1	ns	100	1	ns
3DL2	100	1	100	1	ns	100	1	ns
3DL3	100	1	100	1	ns	97	0.83	0.048
Inhibitory genes								
2DL1	94.9	0.78	93.1	0.74	ns	95.5	0.78	ns
2DL2	53.6	0.32	56.5	0.34	ns	70.1	0.45	0.017
2DL3	88.5	0.66	86.5	0.63	ns	73.1	0.48	0.003
2DL5	49.8	0.28	52	0.31	ns	67.2	0.43	0.013
3DL1	95.3	0.71	98.5	0.89	ns	100	1	ns
Activator genes								
2DS1	34	0.18	44.3	0.25	ns	25.4	0.14	ns
2DS2	56.2	0.34	56.5	0.34	ns	65.7	0.41	ns
2DS3	28.5	0.16	31.6	0.17	ns	52.2	0.31	0.0004
2DS4	95.3	0.77	98.5	0.89	ns	100	1	ns
2DS5	29.4	0.16	31.3	0.17	ns	32.8	0.18	ns
3DS1	34	0.18	42	0.24	ns	25	0.13	ns

KIR, killer-cell immunoglobulin-like receptors.

<sup>a</sup>Gene frequencies estimated with EM algorithm.

<sup>b</sup>Gene frequencies estimated with Bernstein's formula (using carrier frequencies available in AFND).

<sup>c</sup>Differences to Portuguese gene frequencies.

**Table 2** Frequencies for KIR centromere and telomere gene motifs, full-length haplotypes and genotypes in 229 Portuguese

Haplotype organization	F (%)
Centromeric/telomeric gene motifs <sup>a</sup>	
Cen-A/A	40.4
Cen-A/B	48.1
Cen-B/B	11.5
Tel-A/A	63.8
Tel-A/B	31.5
Tel-B/B	4.7
Full-length haplotypes <sup>b</sup>	
Cen-A ~ Tel-A (A)	54.3
Cen-B ~ Tel-A (B)	25.2
Cen-B ~ Tel-B (B)	10.8
Cen-A ~ Tel-B (B)	9.7
KIR genotypes <sup>a</sup>	
A/A	28.5
A/B	41.7
B/B	11.5
B/x	18.3

KIR, killer-cell immunoglobulin-like receptors

<sup>a</sup>Carrier frequencies.

<sup>b</sup>Haplotype frequencies estimated with an EM algorithm.

work, the Cen-A/B genotype shows the highest frequency. The main telomeric genotype was Tel-A/A (63.8%), followed by Tel-A/B (31.8%), whereas the homozygous Tel-B/B genotype was detected in only 4.7% of the individuals. This distribution is similar to those described in related populations (15, 27).

The most frequent full-length KIR haplotype is A (made up of the Cen-A ~ Tel-A motifs, 54.3%) followed by Cen-B ~ Tel-A (25.2%), Cen-B ~ Tel-B (10.8%) and Cen-A ~ Tel-B (9.7%). These three centromeric and telomeric motif combinations are considered as KIR B haplotypes, as described above. In line with what was previously shown (28), no significant GLD was observed between the centromeric and telomeric portions of the KIR gene cluster ( $P=0.136$ ). In addition, using the individual contents of centromeric and telomeric motifs, the KIR full-length genotypes (i.e. across telomeric and centromeric regions) were inferred as described (8). The heterozygous genotype A/B was the most frequent (41.7%), followed by the homozygous A/A (28.5%) and B/B (11.5%). As the genetic phase was not known, it was not possible to define the complete genotype of 42 (18.3%) individuals carrying a Cen-A/B, Tel-A/B profile, and these were classified with a B/x genotype.

Donor-derived NK cells appear early during immune reconstitution following HSCT myeloablative conditioning (29) and alloreactive NK cells target recipient hematopoietic cells, resulting in an antileukemia effect and a lower incidence of graft rejection (30). However, those effects depend on multiple factors, including disease type, presence of T cells, immunosuppressants and the repertoires of allocated KIR genes and recipient HLA ligands (31). Although non-uniformly demonstrated, the capture of NK cell alloreactivity is probably shaped by a KIR ligand incompatibility either in the setting of a HLA class I mismatched transplant, or in the presence of a donor KIR

**Table 3** Distribution of donor KIR gene profiles, recipients HLA class I ligands and KIR-ligand interactions after related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation with local and abroad donors

	Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation		
	Related donor <i>N</i> = 111	Unrelated Portuguese donor <i>N</i> = 101	Unrelated BMDW donor <i>N</i> = 102
Donor: KIR Cen and Tel genotypes <i>n</i> (%)			
Cen-A/A	53 (47.7)	40 (39.6)	44 (43.1)
Cen-A/B	47 (42.3)	45 (44.6)	44 (43.1)
Cen-B/B	11 (9.9)	16 (15.8)	14 (13.7)
Tel-A/A	<b>79 (71.2)****/*</b>	<b>44 (43.6)****</b>	<b>59 (57.8)*</b>
Tel-A/B	<b>30 (27.0)**/**</b>	<b>51 (50.5)**</b>	<b>36 (35.3)**</b>
Tel-B/B	2 (1.8)	6 (5.9)	7 (6.9)
KIR full-length haplotypes <i>n</i> (%)			
A/A	<b>41 (40.6)**/**</b>	<b>18 (17.8)**</b>	<b>24 (23.5)*</b>
A/B	43 (38.7)	42 (41.6)	45 (44.1)
B/x	14 (12.6)	21 (20.8)	14 (13.7)
B/B	13 (11.7)	20 (19.8)	19 (18.6)
KIR-B content classification <sup>a</sup> <i>n</i> (%)			
Neutral	<b>84 (75.7)*</b>	<b>60 (59.4)*</b>	69 (67.9)
Better	16 (14.4)	25 (24.8)	19 (18.6)
Best	11 (9.9)	16 (15.8)	14 (13.7)
Patient: HLA class I ligands <i>n</i> (%)			
C1/C1	24 (21.6)	32 (31.7)	33 (32.4)
C1/C2	63 (56.8)	47 (46.5)	47 (46.1)
C2/C2	24 (21.6)	22 (21.8)	22 (21.6)
Bw4+ (including HLA-A)	86 (77.5)	79 (78.2)	73 (71.6)
Bw4I80+	72 (64.8)	56 (55.4)	58 (56.9)
Only Bw4T80+	14 (12.6)	23 (22.8)	15 (14.7)
Bw4-	25 (22.5)	22 (21.8)	29 (28.4)
Transplant KIR-HLA class I ligand interactions:			
Donor inhibitory KIR presence/recipient HLA class I ligand absence <i>n</i> (%)			
Recipients with all ligands	47 (42.3)	40 (39.6)	31 (30.3)
2DL1+/C2-	24 (21.6)	31 (30.7)	32 (31.4)
2DL2+/C1-	13 (11.7)	8 (7.9)	9 (8.9)
2DL3+/C1-	23 (29.7)	18 (17.8)	17 (16.3)
3DL1+/			
Bw4-	24 (21.6)	20 (19.8)	28 (27.4)
Bw4I80-	14 (12.6)	23 (22.8)	15 (14.7)
Donor activator KIR presence/recipient HLA class I ligand presence <i>n</i> (%)			
2DS1+/C2+	24 (21.6)	34 (33.7)	26 (25.5)
3DS1+ <sup>b</sup>			
Bw4+	29 (26.1)	39 (38.6)	32 (31.4)
Bw4I80+	25 (22.5)	28 (27.7)	27 (26.4)

KIR, killer-cell immunoglobulin-like receptors.

C1, HLA-C(Asn80) group. C2, HLA-C(Lys80) group. Bw4I80, Bw4 with isoleucine 80. Bw4T80, with threonine 80.

<sup>a</sup>Neutral KIR donors have Cen and Tel genotypes with 1 or no B motifs, better have two or more B motifs without Cen-B/B and best have two or more B motifs with Cen-B/B, according to the model proposed by Cooley *et al.* (34).

<sup>b</sup>While KIR3DS1 ligands remain elusive, HLA Bw4 allotypes have been proposed as putative ligands in a peptide-specific manner with a better affinity for the Bw4I80 form (35).

Significant differences in gene/genotype distribution between transplants with related donors, local unrelated donors and from abroad are indicated in bold. For sake of clarity the significance symbol is shown in both columns for a given comparison. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\*\**P* < 0.0001.

locus for which there is no recipient ligand (32). More recently, the effect of graft KIR gene content and ligand interaction in NK cell education and alloreactivity has been investigated (15, 33, 34). A better transplant outcome was first demonstrated for acute myelogenous leukemia (AML) patients transplanted with donors carrying a KIR B genotype (13). A dominant effect was then correlated to a Cen-B content enriched for activator KIR genes and to a lesser extent, to Tel-B genes (15). Recently, a classification for donor's KIR genotypes was proposed as

neutral and better/best based on the sum of their B motifs content (34).

Here, we establish the predicted post-transplant profiles of KIR gene contents and interactions with recipient ligands in transplants with HLA-matched related donors, and unrelated donors from a Portuguese panel of volunteer stem cell donors and from abroad. The KIR repertoire allocated in transplantation is determined by KIR gene frequencies. High-frequency genes such as 2DL1, 2DL3, 3DL3 and 2DS4 were thus easily

allocated, but the presence of KIR genes with a medium and low frequency was found highly heterogeneous after transplantation in both related and unrelated settings. Some diversity was found between donor groups, in particular related donors showed a higher frequency of Tel-A KIR encoded motifs and consequently presented more KIR A/A haplotypes and neutral content (Table 3). The overall distribution of better/best KIR donor contents ranged from 24.3% in related donors to 40.6% in unrelated donors from the local registry. However contrary to neutral content, differences among donor groups for better and best contents were not significant. The recipient's distribution of KIR HLA class I cognate ligands is also shown in Table 3. Recipients from a related transplant showed an even frequency of alleles HLA-C1 and C2 (the ligands for KIR2DL1/2DS1 and 2DL2/2DL3, respectively) and a balanced distribution of the homozygous C1/C1 and C2/C2 genotypes. By contrast, C1/C1 was more frequent than C2/C2 in both unrelated groups. The other main KIR ligand, the Bw4 motif, was found dominant among the three groups (71.6–78.2%). This ligand has a dimorphism between isoleucine or threonine at position 80 (Bw4I80 versus Bw4T80) and the first form is recognized with high affinity by KIR3DL1 (35). Here, the Bw4I80 form was observed at a higher overall frequency, and the distribution of each forms showed no significant differences between groups (Table 3).

Next, the post-transplant missing ligand interactions for each inhibitory KIR were considered. It is important to note that an important fraction of recipients (up to 42.3%) presented a complete ligand repertoire for inhibitory KIRs (with C1, C2 and Bw4) and consequently post-transplant KIR missing ligand interactions are not expected (Table 3). Each HLA-C missing ligand interaction presented a similar distribution between transplantation groups. However, the 2DL3+/C1– showed the highest prevalence in related transplants (29.7%) whereas in unrelated groups the most common was the 2DL1+/C2– interaction present in 30.7 and 31.4% of transplants with local and abroad donors, respectively. Two profiles were evaluated for the 3DL1/Bw4 interaction, the first corresponding to an overall absence of Bw4 and ranging from 19.8 to 27.4% and the second corresponding to the absence of only the high affinity Bw4I80 form and found in 12.6 to 22.8% of transplants. None of these differences were significant.

Activating KIR receptors such as 2DS1 and 3DS1 have been associated with a positive outcome in AML transplants. This effect is probably the result of interactions with cognate ligands which could modulate NK cell education and lower the activation threshold for NK cell (33, 36). HLA-C2 is the ligand of KIR2DS1 and the distribution of transplants showing this interaction ranged between 21.6 and 33.7% (not significant) in related and unrelated local donors, respectively. In regard to the KIR3DS1 receptor, the exact nature of its interactions is still unknown. It is however a molecule with a high structural homology to KIR3DL1 that has been reported to affect disease evolution in Bw4I80 positive patients (37). For this reason, a KIR3DS1/Bw4 interaction has been proposed

and is probably modulated by the nature of the peptide loaded on the HLA molecule (35). The distribution of this putative interaction between 3DS1 and Bw4 and the one with a more specific Bw4I80 form ranged from 26.1 to 38.6% and 22.5 to 27.7%, respectively, and was not significant among the transplant groups evaluated here.

In summary, here we describe the KIR gene diversity and haplotypic organization in Portuguese, which was found closely related to neighboring European populations. In addition, from the distribution of KIR gene motifs allocated after HSCT, we found that the donor KIR – recipient class I ligand interactions are largely independent from the genetic proximity of the donor–recipient pair. This is certainly the result of an independent segregation of KIR and HLA gene clusters, but is also due to a comparable distribution of KIR genes in the donor pools. This information could be valuable, at least for AML patients, where an evaluation and choice of a donor with a KIR gene content specific for recipient HLA allotypes may improve the transplant outcomes.

## Acknowledgments

We are grateful to all the participants of this study and to the staff who helped in sample collection. We thank Cristiana Teixeira for helping in the organization of data.

## Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

## References

1. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little A-M, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* 2008; **112**: 2369–80.
2. Höglund P, Brodin P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 724–34.
3. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; **11**: 237–44.
4. Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol* 2012; **24**: 239–45.
5. Dutta A, Lourembam SD, Pradhan S, Baruah S. KIR diversity in three ethnic populations of Assam state, Northeast India. *Tissue Antigens* 2013; **82**: 48–52.
6. Li H, Pascal V, Martin MP, Carrington M, Anderson SK. Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet* 2008; **4**: e1000254.
7. Pyo C-W, Guethlein LA, Vu Q *et al.* Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. *PLoS One* 2010; **5**: e15115.

8. Moesta AK, Parham P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front Immunol* 2012; **3**: 336.
9. Carrington M, Norman P. *The KIR Gene Cluster [Internet]. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, 2003*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/>.
10. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP *et al.* HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; **305**: 872–4.
11. Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y *et al.* Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 2004; **122**: 1133–6.
12. Momot T, Koch S, Hunzelmann N *et al.* Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 1561–5.
13. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL *et al.* Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2009; **113**: 726–32.
14. Moretta A, Pende D, Locatelli F, Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol* 2009; **157**: 325–31.
15. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA *et al.* Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2010; **116**: 2411–9.
16. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM *et al.* Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 2010; **120**: 4102–10.
17. Nunes JM, Buhler S, Roessli D, Sanchez-Mazas A. The HLA-net GENE[RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. *Tissue Antigens* 2014; **83**: 307–23.
18. Nunes J. Using UNIFORMAT and GENE[RATE] to analyze data with ambiguities in population genetics. *Evol Bioinform* 2015; **11** (S2): 19–26.
19. Gonzalez-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM *et al.* Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res* 2014; **43**: D784–8.
20. Single RM, Martin MP, Meyer D, Gao X, Carrington M. Methods for assessing gene content diversity of KIR with examples from a global set of populations. *Immunogenetics* 2008; **60**: 711–25.
21. Arnaiz-Villena A, Martínez-Laso J, Alonso-García J. Iberia: population genetics, anthropology, and linguistics. *Hum Biol* 1999; **71**: 725–43.
22. Arredi B, Poloni ES, Paracchini S *et al.* A predominantly neolithic origin for Y-chromosomal DNA variation in North Africa. *Am J Hum Genet* 2004; **75**: 338–45.
23. Bosch E, Calafell F, Pérez-Lezaun A *et al.* Genetic structure of north-west Africa revealed by STR analysis. *Eur J Hum Genet* 2000; **8**: 360–6.
24. Comas D, Calafell F, Benchemsi N, Helal A *et al.* Alu insertion polymorphisms in NW Africa and the Iberian Peninsula: evidence for a strong genetic boundary through the Gibraltar Straits. *Hum Genet* 2000; **107**: 312–9.
25. Currat M, Poloni ES, Sanchez-Mazas A. Human genetic differentiation across the Strait of Gibraltar. *BMC Evol Biol* 2010; **10**: 237.
26. Canossi A, Piancatelli D, Aureli A *et al.* Correlation between genetic HLA class I and II polymorphisms and anthropological aspects in the Chaouya population from Morocco (Arabic speaking). *Tissue Antigens* 2010; **76**: 177–93.
27. Hou L, Chen M, Ng J, Hurley CK. Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry. *Genes Immun* 2011; **13**: 47–58.
28. Hollenbach JA, Meenagh A, Sleator C *et al.* Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA. *Tissue Antigens* 2010; **76**: 9–17.
29. Dulphy N, Haas P, Busson M, Belhadj S *et al.* An unusual CD56brightCD16low NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* 2008; **181**: 2227–37.
30. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol* 2010; **22**: 130–7.
31. Linn YC, Phang CY, Lim TJ, Chong SF *et al.* Effect of missing killer-immunoglobulin-like receptor ligand in recipients undergoing HLA full matched, non-T-depleted sibling donor transplantation: a single institution experience of 151 Asian patients. *Bone Marrow Transplant* 2010; **45**: 1031–7.
32. Gill S, Olson JA, Negrin RS. Natural killer cells in allogeneic transplantation: effect on engraftment, graft- versus-tumor, and graft-versus-host responses. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; **15**: 765–76.
33. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH *et al.* HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med* 2012; **367**: 805–16.
34. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA *et al.* Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Immunol* 2014; **192**: 4592–600.
35. O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol* 2006; **178**: 235–41.
36. Venstrom JM, Gooley TA, Spellman S *et al.* Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2010; **115**: 3162–5.
37. Körner C, Altfeld M. Role of KIR3DS1 in human diseases. *Front Immun* 2012; **3**: 1–11.

**Manuscrito 1 em preparação:**

**T cell levels correlate with an enhanced reconstitution of the NK cell compartment after hematopoietic stem cell transplantation.**

**Authors:**

Dario Ligeiro<sup>1</sup>, Manuel Abecasis<sup>2</sup>, Alice Lima<sup>1</sup>, Olga Abade<sup>1</sup>, Paula Videira<sup>3</sup>, Maria Gomes da Silva<sup>2,3</sup>, Helder Trindade<sup>1</sup>

**Authors Affiliations:**

<sup>1</sup> Lisbon Center for Blood and Transplantation, Instituto Português de Sangue e Transplantação, IP, Lisbon, Portugal

<sup>2</sup> Hematology Department, Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, EPE, Lisbon, Portugal

<sup>3</sup> CEDOC, NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal, Lisbon, Portugal

<sup>4</sup> Life Sciences Department, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal

## **Abstract**

The control of myelogenous minimal residual disease after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been associated with an early reestablishment of NK cells functionalities. Here, we addressed the relation between the reconstitution of the NK and T cell compartments by the evaluation of two transplant models; the allogeneic (allo-HSCT) and the non-immune modulated autologous (auto-HSCT). While both transplant groups had similar numerical recovery of total NK cells, T cells levels were higher in auto-HSCT patients; However, NK cell subsets proportions differed between groups. Allo-HSCT patients had an arrested NK cell development with expansion and accumulation of immature CD56<sup>++</sup> cells. The auto-HSCT group had normal CD56<sup>++</sup> cells levels and an improved recovery of mature CD56<sup>dim/-</sup> NK cells. These differences in the NK cell compartment development were found related to the post-transplant mature CD4<sup>+</sup> T cell levels and to a lesser extend with levels of CD8<sup>+</sup> T cells. Higher levels of both T cell subsets were associated with a less expanded CD56<sup>++</sup> cell population and a higher proportion of mature NK cells. These clinical findings point to a complex network of cellular interactions between adaptive and innate immune cells where T cells may support the development of NK cells.

## 1. Introduction

Natural Killer (NK) lymphocytes are innate lymphoid cells with two major effector functions; the release of immunoregulatory cytokines and direct cytotoxicity of virus infected and tumor transformed cells [1].

In humans, the peripheral NK cell pool comprises up to 15% of all lymphocytes and is composed by at least four functionally distinct subsets, with phenotypes distinguished by the extent to which cells express the CD56 and CD16 markers [2-4]. In normal individuals, around 90% of circulating NK cells are classified as CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>. This subset demonstrates a limited proliferative potential and expresses a mature receptor repertoire aimed at the control of cytotoxic and pro-inflammatory effector functions [5]. A small NK cell population shows high surface density of CD56 and absent or reduced CD16 expression (CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-/+</sup>) [6]. These cells have enhanced proliferative, migratory and immunoregulatory abilities but reduced cytotoxicity and are dominant in secondary lymphoid tissues, where they putatively differentiate into CD56<sup>dim</sup> NK cells [7,8]. Additionally, a poorly characterized CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> cell population was recognized as a terminally differentiated NK cell subset, [9] reported to accumulate in human chronic viral infections and hyporesponsive under those conditions [4,10].

The innate effector functions of NK cells are under the dominant control of a stochastic repertoire of inhibitory receptors, recognising the cellular expression HLA class I molecules, which include the conserved CD94/NKG2A complex and the variable killer immunoglobulin-like receptor family (KIR) [11,12]. A compromised expression of HLA self-ligands, e.g. by transformed cells, results in a loss of this dominant-negative signal, which in turn allows a large set of activating NK cell receptors to trigger cytokine release and cytotoxic activity [13,14].

After hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), NK cells are the first lymphocytes to reconstitute and their innate anti-tumour mechanisms have been exploited to improve clinical outcomes. An alloreactive reaction by graft-derived NK cells, probably determined by the allocated KIR genetic repertoire, [15-17] has been recognized against residual malignant myelogenous cells [18,19]. However, a uniform prediction of this NK cell mediated graft-versus-tumor effect has been hard to establish. Normalization of NK cell numbers after allogeneic transplantation (allo-HSCT) is well established, a fast rebound of immature CD56<sup>++</sup> cell populations,

probably driven by peri-transplant high cytokine levels, [20] preceding a slower recovery of mature CD56<sup>dim</sup> NK cells [21,22]. Yet, the reconstitution of NK cell activity is still poorly understood. The presence of graft T cells, [23,24] the use of T cell depleting immunosuppressants or others, [25,26] and the intensity of transplant conditioning regimen [27] are the most widely reported factors conditioning post-engraftment NK cell reconstitution and functional activity [20,28].

## **2. Objective**

In this study we aimed to detail the post-engraftment NK cell compartment after HSCT and evaluate the relationship between T cells and NK cell reconstitution. We analysed the recovery NK cells in patients submitted to allo-HSCT, within an immunosuppressive setting and the one made by non-immune modulated patients undergoing autologous transplantation (auto-HSCT). The relationship between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte reconstitution and the composition of peripheral NK cell pool was also evaluated. This in turn, can be important for the prediction of recovery of the beneficial NK cell effector functions after transplant.

## **3. Materials and methods**

### **3.1. Patients and samples**

One hundred and forty-nine patients submitted to HSCT in a single center, between January 2010 and December 2013 were included in this study. An allogeneic graft was given to 62 patients, 26 (42%) from an HLA genotypic identical sibling and 36 (58%) from an HLA matched unrelated donor. 87 patients received an autologous transplant. Details on patients' characteristics, underlying disorders, grafts, graft-versus-host disease prophylaxis and engraftment are reported on table 1.

Peripheral blood samples were collected from patients at month 3, 6 and 12 after transplant. Patients with refractory relapse of primary malignant disease or allogeneic graft failure were excluded from the analysis.

A control group of 35 adult healthy individuals (38.2 years median age, range 18-66 years, 52% females, 48% males) was used to establish normal cell ranges, with experimental conditions similar to patients. A local Ethical Committee approved the study and written informed consent was obtained from patients and controls.

### **3.2. Flow cytometric determination of T and NK cell subsets**

Blood cells were stained with the antibodies anti-CD2-APC (clone S5.2), anti-CD3-

FITC (clone UCHT1), anti-CD4-PECy7 (clone SK3), anti-CD8-APC (clone RPA-T8) anti-CD16-PE (3G8), CD27-PE (clone M-T271), CD45RA-FITC (clone HI100) and anti-CD56-PECy7 (clone 159) (BD Biosciences, San Jose, CA) for four-colour flow cytometric analysis. Data were acquired on a FACSCalibur instrument (BD Biosciences) and analysed with FlowJo 9.8 software (TreeStar, Ashland, OR). Briefly, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were defined and further classified according to CD45RA and CD27 expression to assess the naïve and memory subsets. NK cells were identified as CD3<sup>-</sup>CD2<sup>+</sup> lymphocytes and subsets defined according to CD56 and CD16 expression. The limits of positive gates were defined for each assay with isotype-matched antibodies.

### **3.3. Statistical analysis**

Absolute cell counts and frequencies, as non-normal distributions, were expressed as median and interquartile range. Values for controls were categorized as 10<sup>th</sup>-90<sup>th</sup> percentiles and used as normal reference range. The Mann-Whitney U-test was used to compare these continuous variables between patients, controls and time-points. Significance was defined by  $p < 0.05$  using a two-tailed test. Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 6.g (GraphPad Software, La Jolla, CA).

## **4. Results**

### **4.1. Reconstitution of peripheral NK cell compartments after HSCT**

The analysis of NK cell reconstitution indicated a comparable quantitative recovery of peripheral NK cells after allogeneic and autologous transplants. After 3 months and up to 1-year, median absolute NK cell counts values in the groups of patients were marginally above the lower limits of normal range (125.4 (58.7-195.5), 107.2 (67.5-163.7) and 120.2 (78.5-202.8), 127.9 (97.1-244.0) cells/ $\mu$ l; allo and auto-HSCT at 3 and 12 months after transplant, respectively, versus control 91.5-649.5) (Figure 1Ai and 1Bi). However, the NK subsets from each transplant group presented notable differences. Allo-HSCT patients showed an early rebound of immature NK cell subsets, with an expansion of early immature CD16<sup>-</sup>CD56<sup>++</sup> and intermediate stage CD16<sup>+</sup>CD56<sup>++</sup> cell populations, most evident at 3 months after transplantation (14.6 (7.8-30.5) and 29.9 (20.6-73.6) cells/ $\mu$ l versus normal range, 3.6-12.7 and 6.0-26.9), respectively, (figures 1Bii and iii). Immature NK cells presented a steady decline to normal levels since month 6.

By contrast, CD16<sup>-</sup>CD56<sup>++</sup> cell counts were within normal range since the first evaluation after auto-HSCT, with no significant variations afterwards (8.4 (4.8-14.8), 7.4 (4.9-11.9) and 6.7 (4.5-12.0) cells/ $\mu$ l) (at 3, 6 and 12 months respectively, versus normal range 3.6-12.7) (figure 1Aii). The CD16<sup>+</sup>CD56<sup>++</sup> cell numbers were also found normal at each time-point (21.5 (14.7-35.6), 19.5 (11.1-34.0) and 18.7 (11.0-32.3) cells/ $\mu$ l at 3, 6 and 12 months respectively, versus normal range 6.0-26.9) (figure 1Aiii).

Both transplant groups presented a significant depletion of mature CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK cells. The recovery of these cells was slow and considerably more delayed in allo-transplant recipients. In fact, after 12 months, these patients maintained CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> median cells counts below normal range (60.8 (34-123) cells/ $\mu$ l versus normal range 68.4-452.7) (figure 1Biv). Auto-HSCT patients presented a more efficient recovery, showing median CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK cell counts within the normal range 6 months after transplantation (86.5 (54.3-163.2) cells/ $\mu$ l) (figure 1Aiv).

Finally, the analysis of the CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> NK cells, a putative terminally differentiated subset, showed that auto-HSCT patients presented median cell counts within normal ranges at all time points of the analysis (figure 1Av). Patients recovering from allogeneic transplantation, on the other side, showed a reduced CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> cell population with no significant changes at each assessment during the first year after procedure (figure 1Bv).

#### **4.2. T lymphocyte counts and subsets proportions after transplantation**

As expected, and summarized in table 2, recipients from auto and allo-transplants were affected by a severe CD4<sup>+</sup> T cell lymphopenia and a disturbance of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> naïve and memory T cell subsets during the analysis period. It is important to note that the immune-suppressive prophylaxis necessary to successful allogeneic transplantation has a major impact on the post-transplant recovery of the two T cell subsets. Consequently, auto-HSCT recipients presented a higher CD4<sup>+</sup> T cell pool than allo-HSCT patients at 3 (273.8 (179-362) versus 106.9 (42-200) cells/ $\mu$ l;  $p < 0.0001$ ), 6 (281.5 (186-392) versus 198.0 (96-288) cells/ $\mu$ l;  $p < 0.001$ ) and 12 months (351.8 (259-504) versus 247.6 (153-245) cells/ $\mu$ l;  $p = 0.03$ ).

Both transplant groups recovered CD8<sup>+</sup> T cell counts during this follow up analysis. As soon as 3 months after transplantation, auto-HSCT recipients had CD8<sup>+</sup> cell counts above normal ranges ( $p = 0.04$ ) that were maintained until 1 year (table 2). Allograft recipients had depleted CD8<sup>+</sup> cell levels ( $p < 0.001$ ) at month 3. However,

these counts normalized in subsequent evaluations (table 2). The CD8<sup>+</sup> T cell pool from auto-HSCT patients was significantly larger than in the allo-HSCT group only at months 3 and 6 (640.8 (367-1006) versus 264.9 (91-491) cells/ $\mu$ l;  $p < 0.0001$  and 472.4 (337-870) versus 333.7 (143-680) cells/ $\mu$ l;  $p < 0.01$ ) (auto versus allo-HSCT patients at month 3 and 6 respectively).

The evaluation of the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell compartments revealed a severe reduction of CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> naïve subsets. Consequently, the reconstitution of T cells was dominated by memory phenotypes (table 2). The most disturbed CD4<sup>+</sup> memory subset was the CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> memory effector cells (T<sub>EM</sub>) with proportions significantly above normal range during the entire follow-up (table 2). Regarding the CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> central memory cells (T<sub>CM</sub>), which is normally the major CD4<sup>+</sup> T cell subset, post-transplant frequencies were initially elevated (at 3 and 6 months) but gradually decreased to normal by 1-year post transplant (table 2).

The composition of the CD8<sup>+</sup> T cell compartment in both groups was initially dominated by CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells, which were found normal on auto-HSCT recipients since 3 months post-transplant and presented a trend for a decrease, more pronounced in the allo-HSCT group. A progressive expansion of CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> end-stage memory (T<sub>EMRA</sub>) cells was also noted in both groups and at 1-year post-transplant these cell frequencies were above normal ranges ( $p < 0.001$  for both auto and allo-HSCT groups) (table 2).

#### ***4.3. T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells relation with the reconstitution of NK cell compartment***

For this analysis, patients receiving allogeneic and autologous grafts were segregated into two groups, according to their individual levels of circulating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells; those groups were compared for the NK cell subset composition. The first group included patients with CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell counts under the first quartile of the overall distribution (<25<sup>th</sup> P) and the second was composed by those with counts above the median level (>50<sup>th</sup> P). These patient groups presented significant variations of NK cell subsets proportions that are summarized in table 3.

At 3 months, patients with lower CD4<sup>+</sup> T cell numbers had significantly higher frequencies of both immature CD16<sup>-</sup>CD56<sup>++</sup> and CD16<sup>+</sup>CD56<sup>++</sup> NK cell subsets ( $p = 0.044$ ,  $p < 0.0001$  and  $p = 0.023$ ,  $p = 0.032$  for auto and allo-HSCT patients, respectively). Therefore, a higher proportion of mature CD56<sup>++</sup> cells were present in the peripheral NK cell niche of patients with higher CD4<sup>+</sup> T cell counts ( $p = 0.049$  and

$p=0.001$  for auto and allo-HSCT respectively). This correlation was extended to the CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> terminal differentiated NK-subset only in patients recovering from autologous transplantation ( $p=0.0005$ ).

At the same time point, patients receiving allogeneic transplant and presenting CD8<sup>+</sup> T cell levels in the lower quartile also had higher frequencies of both early and intermediate immature NK cell subsets ( $p=0.026$  and  $p=0.0036$ , respectively). Accordingly, a higher frequency of CD56<sup>dim</sup> cells was found in the group with higher CD8<sup>+</sup> cell levels ( $p=0.027$ ). Autologous recipients behaved slightly differently, with the group with low CD8<sup>+</sup> T cell levels presenting a higher frequency of only intermediate stage CD16<sup>+</sup>CD56<sup>++</sup> cells ( $p=0.01$ ); no significant differences were found in the mature NK cell subsets.

At 6 months after transplant, significant variations of CD16<sup>+</sup>CD56<sup>++</sup> and CD56<sup>dim</sup> frequencies were related with CD4<sup>+</sup> T cell levels only in auto-HSCT patients ( $p=0.014$  and  $p=0.001$ , respectively). No impact of CD8<sup>+</sup> T levels was found at this time. The relationship between the NK and T cell compartment disappeared at the end of the first year post-autologous and allogeneic transplant (data not shown).

#### **4. Discussion**

An influence of graft T cells in the NK cell reconstitution has been suggested from the observations that allografts with extensive T cell depletion were associated with an impaired post-transplant NK cell recovery, [24] which could affect transplantation outcome [23,29]. Here, we have addressed the heterogeneity of NK cell recovery by exploring two different hematopoietic stem cell transplantation settings with a conditioning effect in T cell reconstitution and activity. The analyses were performed in a group of allogeneic graft recipients with pre and post-transplant immunosuppressive prophylaxis and in a second group of patients recovering from an autologous transplant who are not immune modulated.

First, we noted that after an identical peri-transplant quantitative recovery, the composition of the generated NK cell pool was distinct for each of the transplant settings. Patients from the allo-transplant group had a sharp expansion of immature CD56<sup>++</sup> NK cells, whereas autologous patients showed only a moderate increase of those cells. In addition, a considerable delay was seen in the recovery of mature CD56<sup>dim</sup> NK cells in the allogeneic setting. In contrast, the auto-HSCT group showed a faster development of CD56<sup>dim</sup> cells and higher levels of the terminally differentiated CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> NK cell subset. Regarding the T cell reconstitution, both transplant

groups showed similar imbalances in the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cell ratio and in the composition of the naïve and memory subsets. Not unexpectedly, the recovery efficiency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell niches by auto-HSCT patients outpaces that of allo-HSCT patients, most certainly as a consequence of immunosuppressive regimens used to prevent alloreactive T cell mediated morbidities after allogeneic transplantation.

The patterns of NK cell recovery observed here for each transplant setting were in accordance with the involvement of post-transplant T cell levels previously suggested [24]. In a low T cell post-transplant condition, as seen in allo-HSCT patients, a large proportion of circulating NK cells were the immature CD56<sup>++</sup>. Auto-HSCT patients, with higher T cell levels, showed an enhanced NK cell maturation with no accumulation of immature subsets.

We also investigated the specific involvement of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets in the NK cell reconstitution after allogeneic and autologous transplantation. It was found that the early expansion of CD56<sup>++</sup> immature NK cells was associated with low CD4<sup>+</sup> T cells levels, while patients with a higher CD4<sup>+</sup> cell counts showed a more mature NK cell compartment. To a lesser extent, post-transplant CD8<sup>+</sup> cell levels had a similar impact on the early subset composition of the peripheral NK cell compartment. This modulation effect was consistent for both transplant groups at 3-month evaluation. However, at 6-months was only significant for auto-HSCT patients with different CD4<sup>+</sup> T cell levels.

It is well recognized that the lymphocyte recovery after HSCT is shaped by a burst of homeostatic cytokines, produced during and after transplant conditioning by dendritic cells and lymphoid stromal cells [30,31]. These are cytokines from the common  $\gamma$  chain ( $\gamma$ c) family, such as IL-2, IL-7 and especially IL-15, that acting in an autocrine or paracrine fashion induce survival and proliferation of sensitive lymphocyte subsets [32,33]. Early after transplantation, cells with a constitutive expression of IL-15 and IL-2 high affinity receptors, such as CD8<sup>+</sup> T memory cells and immature CD56<sup>++</sup> NK cells, [34] are highly expanded due to a systemic exposition to those cytokines [20,31,35].

Other lines of evidence suggest that a close interaction between dendritic cells (DCs), NK cells and T cells supports the development and functionalities of all these cell compartments [36-38]. DCs were recently suggested as main regulators of T CD4<sup>+</sup> cells homeostasis by supporting cell proliferation through MHC-TCR interaction [39,40]. In fact, the typical low efficiency recovery of CD4<sup>+</sup> T cells is considered in this

model as a probable effect of a downregulation of MHC class II expression, induced on DCs by IL-7 high levels [39]. The link between innate and adaptive immunity is even supported by the demonstration of a co-localization of CD56<sup>++</sup> NK cells and DCs in the T cell areas of lymph nodes [41]. Here, a dynamic cellular cross talk can occur, surface presentation of IL-15 and IL-12 secretion by DCs can induce, CD56<sup>++</sup> NK cell proliferation and activation, respectively [36,41]. The stimulation of the immunoregulatory NK cells can enhance IFN- $\gamma$  production and assist on a Th1 polarization of adaptive immune responses [42]. At the same locations, IL-2 available from T cells further induce a NK cell maturation with acquisition of a mature CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> phenotype and KIR expression [34,43]. Furthermore, the mature NK cells have cytolytic potential for transformed cells that is also effective on immature DCs. As such, mature NK cells might have a role on the selection of an immunogenic DC population during the initiation of immune responses, [36] a mechanism that could be responsible for a preferential ablation of recipient DCs, providing a control of graft-vs-host-disease, suggested to be mediated by alloreactive NK cells [44,45].

These cellular, cytokine mediated interactions suggests that NK cell development could be strongly modulated by limited amounts of these cytokines or by the levels of producer cells. Our finding that CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell levels affect early NK cell recovery after HSCT is consistent with the role of these cells in the process. It is possible that an effective consumption of homeostatic cytokines by an early dominant CD8<sup>+</sup> T cell population determines a limited availability for other sensitive cells. This could explain the decrease of CD56<sup>++</sup> NK cell found in the allogeneic and autologous post-transplants settings. Although other regulatory mechanisms involving regulatory T cells or a competing interaction with DCs can not be excluded, the enhancement of NK cells maturation with high levels of CD4<sup>+</sup> T cells here described is most probably a consequence of endogenous, T cell derived IL-2, acting through the high-affinity IL-2 receptor of CD56<sup>++</sup> NK cells.

In conclusion, this clinical study presents evidence supporting the regulatory circuits between innate and adaptive immunity. Our data highlight the favourable role of mature post-transplant CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells for an early and efficient reconstitution of NK cells. This is a cellular interplay that should be taken in account for the design of NK cell based interventions aimed to control minimal residual neoplastic disease after transplantation.

## Acknowledgements:

We are grateful to all the study participants and to the staff who helped in sample collection.

## References

- [1] Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, et al. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* 2006;25:331–42. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013.
- [2] Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008;112:461–9. doi:10.1182/blood-2007-09-077438.
- [3] Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009;126:458–65. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.
- [4] Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, et al. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 102, 2005, pp. 2886–91. doi:10.1073/pnas.0409872102.
- [5] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633–40. doi:10.1016/S1471-4906(01)02060-9.
- [6] Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010;115:2167–76. doi:10.1182/blood-2009-08-238469.
- [7] Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, et al. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 2007;178:4947–55.
- [8] Eissens DN, Spanholtz J, van der Meer A, van Cranenbroek B, Dolstra H, Kwekkeboom J, et al. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS ONE* 2012;7:e30930–0. doi:10.1371/journal.pone.0030930.
- [9] Bjorkstrom NK, Ljunggren HG, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol* 2010. doi:10.1182/blood-2010-04-281675.
- [10] Gonzalez VD, Falconer K, Björkström NK, Blom KG, Weiland O, Ljunggren HG, et al. Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment. *The Journal of Immunology* 2009;183:6612–8. doi:10.4049/jimmunol.0901437.
- [11] Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935–47. doi:10.1182/blood-2002-02-0350.
- [12] Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little A-M, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* 2008;112:2369–80. doi:10.1182/blood-2008-03-143727.
- [13] Ljunggren HG, Kärre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell

recognition. *Immunology Today* 1990;11:237–44.

- [14] Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Current Opinion in Immunology* 2012;24:239–45. doi:10.1016/j.coi.2012.01.001.
- [15] Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2010;116:2411–9. doi:10.1182/blood-2010-05-283051.
- [16] Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, et al. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med* 2012;367:805–16. doi:10.1056/NEJMoa1200503.
- [17] Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Marsh SGE, et al. Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Immunol* 2014;192:4592–600. doi:10.4049/jimmunol.1302517.
- [18] Gill S, Olson JA, Negrin RS. Natural Killer Cells in Allogeneic Transplantation: Effect on Engraftment, Graft-versus-Tumor, and Graft-versus-Host Responses. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2009;15:765–76. doi:10.1016/j.bbmt.2009.01.019.
- [19] Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol* 2010;22:130–7. doi:10.1097/CCO.0b013e328335a559.
- [20] Dulphy N, Haas P, Busson M, Belhadj S, de Latour RP, Robin M, et al. An Unusual CD56brightCD16low NK Cell Subset Dominates the Early Posttransplant Period following HLA-Matched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunol* 2008;181:2227–37. doi:10.4049/jimmunol.181.3.2227.
- [21] Zhao X-Y, Huang X-J, Liu K-Y, Xu L-P, Liu D-H. Reconstitution of Natural Killer Cell Receptor Repertoires after Unmanipulated HLA-Mismatched/Haploidentical Blood and Marrow Transplantation: Analyses of CD94:NKG2A and Killer Immunoglobulin-Like Receptor Expression and Their Associations with Clinical Outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2007;13:734–44. doi:10.1016/j.bbmt.2007.02.010.
- [22] Béziat V, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadière B, et al. CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *The Journal of Immunology* 2011;186:6753–61. doi:10.4049/jimmunol.1100330.
- [23] 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;106:4370–6. doi:10.1182/blood-2005-04-1644.
- [24] Nguyen S, Kuentz M, Vernant JP, Dhedin N, Bories D, Debre P, et al. Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Leukemia* 2008;22:344–52. doi:10.1038/sj.leu.2405041.
- [25] Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003;102:814–9. doi:10.1182/blood-2003-01-0091.
- [26] 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;110:1530–9. doi:10.1182/blood-2006-10-048173.

- [27] Pical-Izard C, Crocchiolo R, Granjeaud S, Kochbati E, Just-Landi S, Chabannon C, et al. Reconstitution of natural killer cells in HLA-matched HSCT after reduced-intensity conditioning: impact on clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:429–39. doi:10.1016/j.bbmt.2014.11.681.
- [28] Giebel S, Dziaczkowska J, Czerw T, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Nowak I, et al. Sequential recovery of NK cell receptor repertoire after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2010;45:1022–30. doi:10.1038/bmt.2009.384.
- [29] Nguyen S, Dhedin N, Vernant J-P, Kuentz M, Jijakli AI 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;105:4135–42. doi:10.1182/blood-2004-10-4113.
- [30] Cui G, Hara T, Simmons S, Wagatsuma K, Abe A, Miyachi H, et al. Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014;111:1915–20. doi:10.1073/pnas.1318281111.
- [31] Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Seminars in Immunology* 2007;19:318–30. doi:10.1016/j.smim.2007.10.004.
- [32] Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med* 2001;194:1711–9. doi:10.1084/jem.194.12.1711.
- [33] Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003;101:4260–6. doi:10.1182/blood-2002-11-3577.
- [34] Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003;101:3052–7. doi:10.1182/blood-2002-09-2876.
- [35] Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* 2002;195:1523–32. doi:10.1084/jem.20020066.
- [36] Ferlazzo G. Natural killer and dendritic cell liaison: Recent insights and open questions. *Immunology Letters* 2005;101:12–7. doi:10.1016/j.imlet.2005.04.015.
- [37] Morandi B, Mortara L, Carrega P, Cantoni C, Costa G, Accolla RS, et al. NK cells provide helper signal for CD8+ T cells by inducing the expression of membrane-bound IL-15 on DCs. *International Immunology* 2009;21:599–606. doi:10.1093/intimm/dxp029.
- [38] Chijioke O, Muenz C. Dendritic Cell Derived Cytokines in Human Natural Killer Cell Differentiation and Activation. *Front Immun* 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00365.
- [39] Guimond M, Veenstra RG, Grindler DJ, Zhang H, Cui Y, Murphy RD, et al. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nature Immunology* 2009;10:149–57. doi:10.1038/ni.1695.
- [40] Kaye J. Niche marketing: regulation of the homeostasis of naive CD4+ T cells. *Nature Immunology* 2009;10:136–8. doi:10.1038/ni0209-136.
- [41] Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from

secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16606–11.  
doi:10.1073/pnas.0407522101.

- [42] Vitale M, Chiesa Della M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, et al. The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34:1715–22.
- [43] Ferlazzo G, Thomas D, Lin S-L, Goodman K, Morandi B, Muller WA, et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004;172:1455–62.
- [44] Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097–100.
- [45] Ferlazzo G, Münz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:1333–9. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1333.

**Table 1. Clinical characteristics of transplanted patients**

	<b>Autologous HSCT</b>		<b>Allogeneic HSCT</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Number Patients</b>	87		62	
<b>Median Age, years (range)</b>	50 (2-68)		27 (3-66)	
<b>Gender: Male/Female</b>	44/43	50.6 / 49.4	37/25	60/40
<b>Primary Disease</b>				
Malignant	87	100	41	66
Non-malignant	0	0	21	34
<b>Preparative Regimens</b>				
Myeloablative	87	100	62	100
TBI	-	-	11	18
ATG	-	-	36	58
<b>Transplant/Graft Characteristics</b>				
Peripheral blood stem cells	87	100	42	68
Bone marrow	0	0	20	32
CD34 <sup>+</sup> /Kg: Median (range) x10 <sup>6</sup>	3.9 (2.0 to 16)		4.1 (0.1-32.0)	
CD3 <sup>+</sup> /Kg: Median (range) x10 <sup>6</sup>	-	-	15.8 (1.1-46.8)	
Related Donor	-	-	26	42
Matched Unrelated Donor	-	-	36	58
<b>GVHD prophylaxis</b>				
FK506 based	-	-	36	58
CsA based	-	-	26	42
<b>Clinical Outcomes</b>				
aGVHD grade I-II	-	-	13	21
aGVHD grade IV	-	-	2	3
cGVHD	-	-	4	6
<b>Graft function 3 months*</b>				
% Donor WB cells (n=21)	-	-	97 (92-100)	
% Donor CD33+ cells (n=41)	-	-	99 (100-100)	
<b>Graft function 10-12 months*</b>				
% Donor WB cells (n=19)	-	-	99 (80-100)	
% Donor CD33+ (n=30)	-	-	100 (97-100)	

TBI, total body irradiation; ATG, anti-thymocyte immunoglobulin; CsA, cyclosporineA; aGVHD, acute graft versus host disease; cGVHD, chronic graft versus host disease; WB, white blood cells. \*Defined by chimerism analysis: median frequency of donor cells (range)

**Table 2. T cells recovery and reconstitution of naive and memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets after autologous and allogeneic transplantation.**

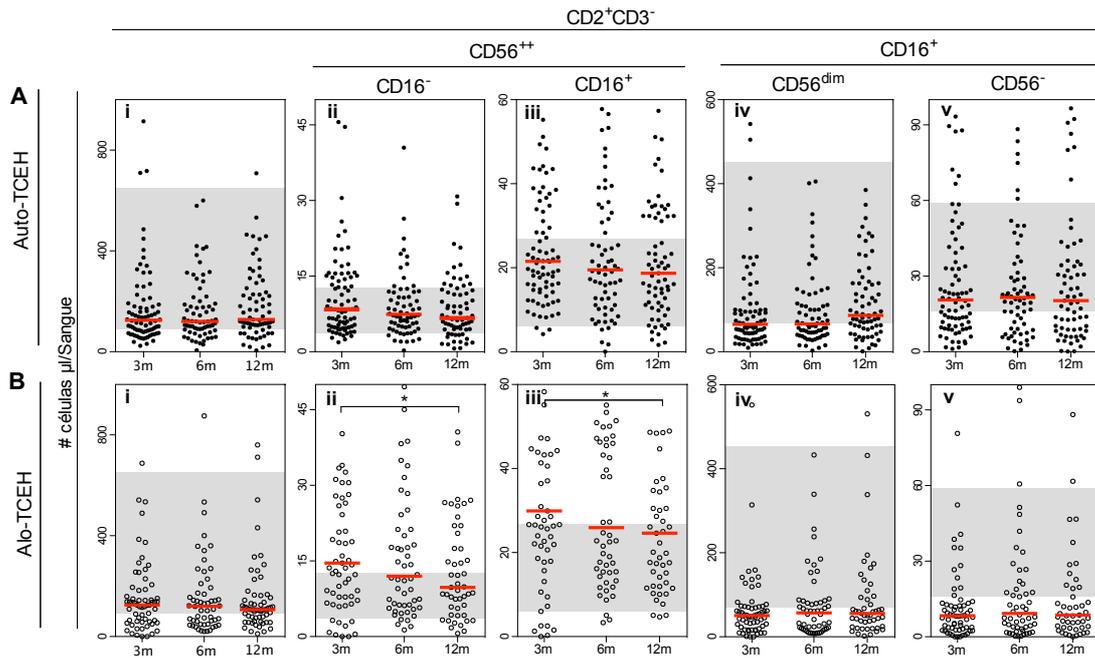
	Controls	Auto-HSCT						Allo-HSCT					
		3m	<i>p</i>	6m	<i>p / p*</i>	12m	<i>p / p*</i>	3m	<i>p</i>	6m	<i>p / p*</i>	12m	<i>p / p*</i>
CD4 <sup>+</sup> (cel/μl)	908.6	273.8	<10 <sup>-4</sup>	281.5	<10 <sup>-4</sup>	351.8	<10 <sup>-4</sup>	106.9	<10 <sup>-4</sup>	198.0	<10 <sup>-4</sup>	247.6	<10 <sup>-4</sup>
Naïves (%)	38.4	5.8	<10 <sup>-4</sup>	8.6	<10 <sup>-4</sup>	12.3	<10 <sup>-4</sup>	6.5	<10 <sup>-4</sup>	14.9	<10 <sup>-4</sup>	21.2	<10 <sup>-4</sup>
T <sub>CM</sub> (%)	47.2	61.5	0.0033	58.5	0.006	51.3	ns	59.6	0.0003	59.1	0.005	57.1	ns
T <sub>EM</sub> (%)	6.8	25.9	<10 <sup>-4</sup>	23.1	<10 <sup>-4</sup>	20.8	<10 <sup>-4</sup>	18.9	<10 <sup>-4</sup>	17.2	<10 <sup>-4</sup>	12.8	0.0006
T <sub>EMRA</sub> (%)	0.8	2	0.02	2.6	0.004	2.1	0.02	1.3	ns	1.3	ns	1.2	ns
CD8 <sup>+</sup> (cel/μl)	525.3	640.8	0.04	472.4	ns	558.4	ns	264.9	<10 <sup>-3</sup>	333.7	ns	430.6	ns
Naïves (%)	40	22.2	0.0002	23.7	0.0003	24.2	0.001	30.3	0.0006	29	0.001	27.5	0.005
T <sub>CM</sub> (%)	29.7	33.4	ns	30.2	ns	25.4	ns	38.1	ns	27.5	ns	21.9	0.01
T <sub>EM</sub> (%)	6.4	11	0.04	13.1	0.005	14.3	0.009	7	ns	6.6	ns	8.5	ns
T <sub>EMRA</sub> (%)	13.9	24.6	ns	23.8	ns	26.8	0.001	18.1	ns	28.5	0.003	31.9	0.001

Auto-HSCT, autologous hematopoietic stem cell transplantation; Allo-HSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; 3m, 6m, 12m, 3, 6 and 12 months after transplantation; Naïves, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> naïve T cells; T<sub>CM</sub>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> central memory T cells; T<sub>EM</sub>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> memory effector T cells; T<sub>EMRA</sub>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> end-stage memory T cells. Median absolute cell counts, frequencies and 10<sup>th</sup>-90<sup>th</sup> interpercentile range are presented for controls. Median absolute cell counts, frequencies and interquartile range are presented for controls. *p*, median patient cell counts compared to control; *p\**, median patient cell counts at 6 and 12 months compared to 3 months; ns, non-significant.

**Table 3. Subset composition of the NK-cell compartment according to CD4+ and CD8+ T cell frequencies.**

		NK cells								
		CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>++</sup>		CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>		CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>dim</sup>		CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup>		
Auto-HSCT	n	% (range)	<i>p</i>	% (range)	<i>p</i>	% (range)	<i>p</i>	% (range)	<i>p</i>	
<b>3 months T cell levels</b>										
CD4 <sup>+</sup>	<25 <sup>th</sup> P	20	7.4 (4.8-14.1)	0.044	24.3 (18.6-29.1)	<0.0001	48.4 (40.4-58.5)	0.049	10.8 (6.0-14.2)	0.0005
	>50 <sup>th</sup> P	41	5.4 (4.0-8.3)		13.2 (9.4-19.2)		56.8 (48.2-61.6)		15.5 (13.0-25.3)	
CD8 <sup>+</sup>	<25 <sup>th</sup> P	21	7.2 (3.9-10.0)	ns	20.5 (15.2-27.5)	0.01	50.9 (41.0-60.1)	ns	13.4 (7.7-17.4)	ns
	>50 <sup>th</sup> P	40	5.3 (4.0-7.9)		13.3 (9.9-18.6)		56.5 (48.9-62.6)		16.5 (12.6-24.8)	
<b>6 months T cells levels</b>										
CD4 <sup>+</sup>	<25 <sup>th</sup> P	17	7.3 (4.4-12.6)	ns	20.3 (15.5-31.1)	0.014	45.7 (32.2-53.1)	0.001	13.2 (6.8-23.2)	ns
	>50 <sup>th</sup> P	35	6.3 (3.5-8.8)		12.2(7.6-18.9)		56.6(45.4-64.5)		19.3 (10.1-25.5)	
CD8 <sup>+</sup>	<25 <sup>th</sup> P	17	5.5 (4.4-10.1)	ns	16.4 (8.1-23.2)	ns	53.5 (35.2-60.7)	ns	19.0 (7.4-26.0)	ns
	>50 <sup>th</sup> P	34	6.4 (4.0-8.2)		12.8 (8.7-19.9)		54.2 (45.1-61.8)		18.8 (10.6-24.1)	
<b>Allo-HSCT</b>										
<b>3 months T cells levels</b>										
CD4 <sup>+</sup>	<25 <sup>th</sup> P	17	20.9 (10.9-25.7)	0.023	33.7 (26.1-45.0)	0.032	34.5 (20.3-42.3)	0.018	6.2 (3.2-10.8)	ns
	>50 <sup>th</sup> P	32	12.3 (6.5-17.1)		26.3 (18.9-36.5)		41.3 (31.2-57.0)		6.7 (3.0-10.19)	
CD8 <sup>+</sup>	<25 <sup>th</sup> P	16	18.8 (11.8-25.0)	0.026	37.6 (27.5-43.2)	0.0036	34.6 (25.1-43.2)	0.027	6.3 (3.9-10.2)	ns
	>50 <sup>th</sup> P	33	10.4 (6.5-17.4)		25.5 (19.3-32.2)		43.7 (31.2-58.1)		7.5 (4.2-11.6)	
<b>6 months T cells levels</b>										
CD4 <sup>+</sup>	<25 <sup>th</sup> P	13	10.2 (6.2-18.8)	ns	28.3 (12.3-40.0)	ns	47.7 (34.5-53.0)	ns	9.0 (1.7-20.0)	ns
	>50 <sup>th</sup> P	26	10.2 (6.1-14.8)		25.6 (16.4-31.8)		44.8 (34.9-55.3)		12.6 (4.5-15.2)	
CD8 <sup>+</sup>	<25 <sup>th</sup> P	13	10.4 (5.2-16.2)	ns	33.7 (17.0-41.0)	ns	45.8 (33.9-50.9)	ns	6.7 (1.7-15.2)	ns
	>50 <sup>th</sup> P	27	10.3 (7.3-20.8)		22.7 (13.1-35.2)		42.2 (35.3-53.4)		11.8 (4.7-17.3)	

<25<sup>th</sup> P, group of patients with CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cell counts below the first quartile of the overall distribution at the analysis time-point; >50<sup>th</sup> P, group of patients with CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cell counts above the median of the overall distribution at the analysis time-point; n, number of patients in each group. Values represent the median and interquartile NK cell subset frequencies. *p*, comparison of NK cell subset frequencies between of patients with different T cell levels at each time point; ns, non-significant.



**Figure 1 – Reconstitution analysis of peripheral NK cell subsets after HSCT.**

NK cell subsets were defined by analysis of CD56 and CD16 differential expression in CD2<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> lymphocytes. A, serial measurements at 3, 6 and 12 months after autologous HSCT, of blood total NK cells (i), high-density CD56<sup>++</sup> immature NK cell subsets CD16<sup>-</sup> (ii) and CD16<sup>+</sup> (iii), mature NK cells CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> (iv) and the putative terminal differentiated NK cell subset CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (v) cell counts. B, the same subsets cell counts from allogeneic transplant patients (i to v). Scatter plots of individual data points are displayed and bars indicate medians. Cell subsets normal ranges (shaded areas) from the 10 and 90% percentiles control values are shown. Cell counts recovery was assessed by Mann-Whitney test between time points and significant differences are indicated, \**P*<0.5.

**Manuscrito 2 em preparação:**

**B cell reconstitution after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: the dynamics and factors marking the recovery process on autologous and allogeneic transplants**

**Authors:**

Dario Ligeiro<sup>1</sup>, Manuel Abecasis<sup>2</sup>, Alice Lima<sup>1</sup>, Isabelina Ferreira<sup>2</sup>, Gilda Teixeira<sup>2</sup>, Nuno Miranda<sup>2</sup>, Olga Abade<sup>1</sup>, Carla Espadinha<sup>2</sup>, Paula Videira<sup>3</sup>, Maria Gomes da Silva<sup>2,4</sup>, Helder Trindade<sup>1</sup>.

**Authors Affiliations:**

<sup>1</sup> Lisbon Center for Blood and Transplantation, Instituto Português de Sangue e Transplantação, IP, Lisbon, Portugal

<sup>2</sup> Hematology Department, Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, EPE, Lisbon, Portugal

<sup>3</sup> Life Sciences Department, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal

<sup>4</sup> CEDOC, NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal

## **ABSTRACT**

While autologous (auto-) and allogeneic (allo-) Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), have different clinical goals, and the second is conditioned by allogeneic immune responses, both procedures show some similarities. Patients are submitted to a myeloablative conditioning and initiate an immune-hematological reconstitution process, associated to post-transplant complications. To identify factors influencing B cell reconstitution, we evaluated B cell lymphopoiesis and peripheral subsets after auto- and allo-HSCT. Both groups were assessed by sj-KREC and immunophenotypic analysis and showed an intense B cell neogenesis followed by an arrest in cell maturation. Peripheral cell pool showed an expansion of transitional CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells and depleted levels of mature subsets CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> and CD27<sup>++</sup> cells, persistent 12 months post-transplant. Cells division's ratio and IgM heavy chain repertoire showed no distinct clonal expansions indicative of homeostatic proliferations. Delayed recovery of mature B cell subsets was associated with elderly on auto-HSCT patients and high-grade GVHD on allo-HSCT. Recovery efficiency was correlated with early higher levels of sj-KRECs and CD4<sup>+</sup> cells on both groups. sj-KREC and immunophenotypic analysis are potential tool for monitoring B cell outcome of auto- and allo-HSCT patients.

## 1. INTRODUCTION

B cells are effector cells of the adaptive immune system producing antigen specific antibodies important for the defence against pathogens. In parallel with the T cells counterpart, the reconstitution of the B cell compartment, after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT), is a slow process [1], where patients are retarded in mounting effective humoral responses [2], and become deprived of the immunological memory, even the preventive memory induced by vaccination [3-5].

It is currently accepted that humoral immunity recovery after HSCT is a progressive reinstatement of adult B cell ontogeny [6,7], a stepwise process where selected bone marrow-generated B cell precursors exit to the periphery in an immature transitional state [8]. In the post-HSCT context, B cell absolute counts, which are usually normalized 12 months after transplant [9], are not indicative of antigen specific humoral competence since a significant proportion of those are functionally immature transitional B cells and pre-naïve B cells [10-12]. B cell ontogeny includes a differentiation through the transitional stages to the mature naïve CD19+CD5-CD27-IgM+IgD+ phenotype able to recognize cognate antigens and further differentiate into early IgM producing cells [13,14]. Alternatively, if challenged by CD4+ T cells and cytokine stimulation at secondary lymphoid tissue follicles, late transitional/early naïve cells are recruited to B cell germinal centres (GCs) for antigen education [14]. Here, random somatic hypermutation of immunoglobulins (Ig) genes and class switch recombination of IGH locus [8,13] lead to cells able to produce high affinity Ig selected for clonal expansion that exit into peripheral blood as long-lived subsets [15]. These are

distinguished by the expression of CD27 and IgM, as IgM memory cells CD27+IgM+ [16], class switched memory cells CD27+IgM- [11,16] and plasmablast cells CD27++; the latter being the in transit precursors of antibody secreting plasma cells [17,18]. An arrest in B cell differentiation and maturation in GC, results in a deficiency of antigen educated cells and is the most probable cause of the impairment and delay of B cell function after HSCT [12,19]. Therefore, monitoring of phenotypic changes on peripheral B cells following HSCT, could help to define patient's immune status and provide guidance on both infection prophylaxis and vaccination schedules [13,20]. Moreover, B cell differentiation homeostasis disconcerts could lead to a continued impairment of the humoral immunological competence or a defective tolerance revealed as autoreactive or alloreactive complications. [21-23].

In this study we evaluated the first 12 month-kinetics of B cell lymphopoiesis, mature

subsets recovery and clonotypic diversity of the IgM heavy chain repertoire during reestablishment of immunohematopoietic function after autologous (auto-) and allogeneic (allo-) HSCT. Our results show a reconstitution driven by an intense B cell neogenesis on both types of transplant. Factors with a negative effect on lymphopoiesis, such as patient's higher age and severe graft versus host disease (GVHD), in the auto- and allogeneic context respectively, are correlated with a deficient reconstitution of mature and antigen educated memory B cells. Furthermore, our analysis of early post-transplant lymphopoiesis mechanisms, suggest the quantification of signal joint sequences enclosed in the K-deleting recombination excision circles (sj-KRECs) as an efficient assessment of B cell maturation efficiency, which could prove to be useful in early identification of patient's outcome.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Patients and sample collection**

The study enrolled 149 patients with both malignant (n=128, 85.9%) and non-malignant (n=21, 14.1%) disorders submitted to HSCT in a single Center, between January 2010 and December 2011. An auto-HSCT was given to 87 (58.3%) patients. The remaining 62 (41.6%) patients received an allo-HSCT, 26 (17.4%) from a HLA genotypic identical sibling and 36 (24.2%) from a HLA matched unrelated donor (MUD). Details on patient's, primary disease status, therapy/conditioning regimens, graft characteristics and clinical outcome are reported on table I. It is noteworthy, the low frequency of clinically severe forms of GVHD in the allo-HSCT group (3% of acute GVHD grade III-IV and 6 % chronic GVHD).

Peripheral whole blood samples were collected at 3, 6 and 12 months after transplant for hemato-immunological recovery analysis. Patients with refractory relapse of primary malignant disease or allogeneic graft failure as detected by chimerism analysis (0% donor in whole blood or CD33+ cells) were excluded from the analysis.

A control group of 35 adult healthy individuals (38.2 years median age, range 18-66 years, 52% females, 48% males) was used to establish normal counts and ranges of haematological cell types, physiological sjKRECs (colocar extenso k-deleting recombination excision circles) levels, peripheral B cell divisions rate and IGH repertoire; by the same experimental conditions used on patients. A local Ethical Board approved the study and written informed consent was obtained from patients and control individuals.

## **2.2. Quantification of sj-KRECs and estimation of peripheral B cell proliferation.**

A qPCR assay was conducted to determine the sj-KRECs sequences in peripheral blood. The primers, probes and conditions were used as previously described [24] with minor modifications. Briefly, DNA was extracted from 1 ml of whole blood with DNAzol BD reagent (Life Technologies, Glasgow, UK), 125 ng DNA was used for PCR amplification with 1x Taqman Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City, CA), 900 nM of 3'/5' outer primers and 250 nM of probes (FAM-TAMRA for TRAC and JOE-TAMRA for sj-KRECs). Sequence copy numbers were extrapolated from standard curves obtained by 10-fold serial dilutions of a triple-insert plasmid, which contains TREC, KREC and TRAC fragments in a 1:1:1 ratio (a kind gift from L. Imberti, Spedali Civili of Brescia, Italy) [24]. sj-KREC copies per  $\mu$ l of blood were calculated from the number of genome normalized sj-KREC molecules corrected for the number of white blood cells in peripheral blood [25]. Finally, the number of B cell divisions was estimated as reported: somatic coding joints sequences cj-RssKde resulting from kappa-deleting rearrangement were quantified by qPCR, the difference of signal joint cycle threshold (Ct) to the coding joint Ct represents an estimate of divisions B cells had undergone [26,27]. Threshold lines for Ct determination were positioned at the same level.

## **2.3. Immunophenotypic analysis of peripheral B cells**

Freshly drawn blood was washed with phosphate buffer saline and stained for flow cytometric phenotypic characterization with the following fluorescent monoclonal antibodies: anti-CD19-PECy7 (clone SJ25C1), anti-CD5-APC (clone UCHT2), anti-CD27-PE (clone M-T271), anti-CD24-FITC (clone ML5), anti-CD38-PE (clone HB7) and anti-IgM-FITC (clone G20-127), from BD Pharmingen (BD Biosciences, San Jose, CA). A minimum of 100 000 events was collected on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) for adequate cell subsets assessment. Data were analysed using FlowJo software version 9.7.4 (TreeStar, Ashland, OR) using matched isotype controls. Using the gating strategy depicted in supplemental Figure 1S, we determined the absolute sizes or proportions of the following peripheral B cell subsets: pre-naïve cells: pre-naïve cells CD19+CD5+CD27-; putative human like B-1/natural IgM subset CD19+CD5+CD27+IgM+ [28]; transitional T1 cells CD19+CD5+CD24+++CD38+++ [29]; transitional T2 cells CD19+CD5+CD24++CD38++ [29]; transitional T3 cells CD19+CD5+CD24+CD38+ [11,29]; mature naïve cells CD19+CD5-CD27-IgM+ [14]; memory IgM cells and class

able to switch memory cells CD19+CD5-CD27+IgM+ [16]; memory switched cells CD19+CD5-CD27+IgM- [11,16] and plasmablast cells CD19+CD5-CD27++ [14]. Absolute cell numbers were determined with differential blood counts.

#### **2.4. IgM heavy chain CDR3 repertoire analysis of peripheral B cells**

Diversity of IgM immunoglobulin heavy chain (IGH) was evaluated with a CDR3 spectratyping assay. 1-2 µg total RNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) fractions was used for cDNA synthesis with the Superscript III system (Invitrogen, Carlsbad, CA). Amplification of the IGH CDR3 was performed in 6 different PCR reactions, each with a leader sequence primer specific for heavy chain variable region genes (IGHV) IGHV1 to IGHV6 families [30] and a common reverse primer homologous to the 5' end of IGHM gene [31] under the following conditions: 0.5 µl cDNA, 500 nM primers, 2 UI of Platinum Taq polymerase (Invitrogen), 200 µM dNTPs and 2 mM MgCl<sub>2</sub>. PCR conditions were 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 45 s, 72°C for 1 min.. A run-off reaction with 0.5X PCR buffer and 100 nM of a labelled primer located in IGHV frame region 3 [31] (6FAM-5'-ACACGGCCGTGTATTACTGT-3') was used to extend 2 µl aliquots of each IGHV amplicon for 10 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min and a final 72°C extension for 20 min. Labelled fragments were separated on a capillary electrophoresis based DNA automated sequencer (Applied Biosystems) and analysed with GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). Profiles of transcribed IGH repertoires were classified based on peak number, distribution shape and relative fluorescence intensity (RFI) of each peak (%RFI= 100 x clonal peak area/total peak area) [32].

#### **2.5. Statistical analysis**

Cell subsets absolute counts and frequencies, as non-normal distributions, were expressed as median and interquartiles range (M, IQR). Control levels used to establish normal reference ranges expressed as 10<sup>th</sup>-90<sup>th</sup> percentiles range (PR). Cell counts comparisons between time-points were assessed with Mann-Whitney U test. Variables interdependences tested with Spearman nonparametric correlation test. Patients were grouped by pre- and post-transplant variables in 2x2 tables to determine impact on cell subsets recovery with a cut-off point defined as the 10<sup>th</sup> percentile of the normal reference. Categorical variables from controls and patients IGH CDR3 diversity types were also compared by Fischer exact test. All tests performed were 2-sided and considered significant if  $P < 0.05$ . Statistical analysis was

performed using the software GraphPad Prism 6.d (GraphPad Software, La Jolla, CA).

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Evaluation of post-HSCT B cell neogenesis and peripheral cell proliferation rate**

To assess post-transplant B cell neogenesis dynamics, we determined the number of sj-KRECs in patient's blood. Sj-KRECs episomes are by-products from the light chain immunoglobulin gene rearrangement, and their quantity is directly associated with newly bone marrow derived B cells [26]. After 3 month of HSCT both autologous and allogeneic groups showed sj-KRECs counts in the control normal range (autologous: 37.3, 7.7-77.4; allogeneic: 14.6, 3.13-35.14; control: 9.1-42.0). However, while allo-HSCT stabilizes sj-KRECs levels at 6 month, auto-HSCT showed a continued increase to levels above normal range at 12 months evolution (60.4, 24.0-106.8) (Figure 1A).

Our evaluation of peripheral B cell divisions showed that both groups had a low or absent cell proliferation compared to controls at all time points. Auto-HSCT group showed a significant increase of B cell divisions at 6 months (1.0, 0.0-1.0;  $P<0.0003$ ). The allo-HSCT patients showed no significant proliferation history of peripheral B cells even after 12 months post-transplant (Figure 2B).

#### **3.2. Determination of B cell recovery: the CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> core subset**

Analysis of the B cell compartment revealed that 6 month after auto-HSCT, patient's CD19<sup>+</sup> cell median counts are in the normal range (128.4, 46.7-269.2; control: 84.6-302). The allo-HSCT group only managed a normal CD19<sup>+</sup> cell count after 12 months (119.0, 64.2-309.0). In line with previous reports [33,34], both transplant groups showed a major proportion of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> circulating B cells, throughout 12 months r after transplant, The median frequencies of these cells (% of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells relative to total CD19<sup>+</sup> cells) in auto-HSCT patients were 82%, (75.3-86.9); 65.8% (54.1-75.7) and 56.2% (45.8-63.5) at 3, 6 and 12 months evolution respectively. The allo-HSCT group showed 69.2% (33.3-78.7), 59.0% (36-74.7) and 54.1% (30.1-63.9) at the same time points. These proportions were all significantly higher when compared to controls (19.8%, 8.7-38.2) ( $P<0.0001$ ). To further analyse the CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cell compartment, we considered the differential expression of the maturation marker CD27. The auto-HSCT group showed an expansion of cells with

the transitional phenotype CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> most evident at 12 months post-transplant (110.3, 54.9-204.1; control: 12.1-64.0) (Figure 2Ai). The allo-HSCT patients presented median counts of the same cell subset on normal range at all time points of the study (Figure 2Aiii). A small subset of cells with a phenotype CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> was also quantified as the potential producers of natural polyspecific IgM. The data revealed an increase from a depleted level at 3 months, to a normal level at 6 months on auto-HSCT patients, as for the allo-HSCT, only after 12 months evolution median cell counts were in the lower limit of normal range (Figure 2Aii and 2Aiv). To assess the course of transitional B cell development we also evaluated the frequencies of the transitional fractions T1 (CD24<sup>+++</sup>CD38<sup>+++</sup>), T2 (CD24<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup>), and T3/pre-naïve (CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) on a group of patients at the study time points. The highest proportion of T1 and T2 cells were found at 3 months (Figures 2Bi and 2Bii). After that, it was evident a progressive decrease to normal cell range frequencies. The latter T3 population showed a corresponding progressive increase as a result of phenotypic differentiation of previous transitional cell subsets (Figure 2Biii).

### **3.3. Reconstitution of the CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> core subset**

Our next focus was the analysis of the CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> population; comprising both mature naïve cells and antigen educated responsive cells, in allo- and auto-HSCT. Both groups of patients restored the naïve CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> subset cell counts to normal ranges on the 12 months post-transplant (auto-HSCT: 68.8, 29.45-122.1; allo-HSCT: 32.2, 13.2-112.6; control: 23.7-120.3) (Figure 3Ai and 3Bi). In respect to the two subsets of memory cells CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> and CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>, these showed extremely depleted levels at the third month analysis in both auto- and allo-HSCT groups (Figures 3A and 3B, ii to iii). After 12 months evolution, CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> subset median cell counts were still below normal ranges on both patients groups (auto-HSCT: 5.0, 2.6-9.2; allo-HSCT: 2.3, 0.7-5.8; control range: 9.3-72.3) (Figure 3Aii and 3Bii). As for class switched memory cells CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>, after 12 months, auto-HSCT patients median cells counts reach the lower limit of control range while allo-HSCT showed a slow recovery maintaining depleted cell levels at the same time point (auto-HSCT: 7.0, 2.0-13.5; allo-HSCT: 2.6, 0.7-8.0; control range: 6.6-41.0) (Figure 3Aiii and 3Biii). On both groups plasmablast CD27<sup>++</sup> medium cell counts were below control range after 12-month evolution (auto-HSCT: 0.6, 0.2-1.3; allo-HSCT: 0.4, 0.03-1.0; control range: 0.8-6.4) (Figure 3Aiv and 3Biv).

### **3.4. IGH repertoire used on B cell reconstitution**

To further characterize B cell reconstitution after HSCT, we used a complementary determining region 3 (CDR3) size distribution assay (spectratyping), to define the Ig heavy chain (IGH) transcript diversity used on the assembly of IgM. This approach address if *IGHV* gene use is object of any restriction or perturbation during the immunological recovery by defining the distributions of CDR3 types for each of the *IGHV* gene families. In line with previous reports [35,36], on both patients and controls, the gene families with the highest number of functional genes *IGHV1*, 3 and 4, accounted for the vast majority of IGH V-D-J productive rearrangements used on IgM transcripts (Figure 4A). In fact, those *IGHV* gene families' spectratypes showed not only the highest relative fluorescence but also the maximum complexity with the highest number of peaks (Figure 4Bi). Compared to the control group, both auto- and allo-HSCT recovering patients presented some degree of perturbation on used *IGHV1,3* and 4 repertoires (Figure 4Ai and 4Aii, respectively) with a trend for enlargement of repertoire diversity along the transplant evolution. The differences between control and patient's repertoire complexity reached only marginal statistical significance for *IGHV3* genes ( $P < 0.5$ ). Additionally, highly skewed or oligoclonal IgM IGH repertoires (Figure 4Bii) were found almost exclusively on patients distinguished by a modest reconstitution of the B cell compartment with low sj-KREC levels and peripheral B cell frequencies. Finally, it was observed that reconstitution patients for both transplant types showed a higher expression and complexity of the *IGHV* gene families with low number of genes *IGHV2*, 5 and 6 ( $P < 0.01$ ).

### **3.5. Impact of pre- and early post-transplant factors on mature B cell subsets recovery**

The incidence of severe aGVHD (grade III-IV) or cGVHD was relatively small in the allo-HSCT patients cohort of our study. Only 2 patients (3%) had aGVHD grade IV and 4 patients (6%) had cGVHD. These patients showed a profound deficit on B cell lymphopoiesis at 6 months, when compared with patients with no aGVHD or patients affected with low-grade aGVHD (table II). At 12 months evaluation, all aGVHD grade IV patients were deceased, while the cGVHD patients, 2 showed an overall recovery of the B cell compartment while the 2 others had retained the B cell lymphopenia. Patients with low-grade aGVHD I, II (13 patients, 21%) show an identical B cell reconstitution profile at both 6 and 12 months evaluation when compared with patients free from GVHD (table II).

We then analysed both cohorts for factors that may impact the recovery of the following peripheral blood mature B cell subsets: CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>, CD5<sup>-</sup>

CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> and CD5<sup>-</sup>CD27<sup>++</sup>. At 3 and 6 months of evaluation a significant proportion of patients were lymphopenic for mature B cells subsets. Patients with 12 months survival were grouped by clinical factors and its cell subset recovery defined as the 10<sup>th</sup> percentile of the absolute cell count from the control population. Table III presents the factors correlated with this recovery for one or more of the mature B cell subsets. On the autologous transplant population younger patient age was positively correlated with the recovery of the memory subsets CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+/-</sup> and CD27<sup>++</sup> cells ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0036$  and  $P = 0.0265$  respectively). By contrast, diagnosis of viral infections had a remarkable negative effect on the terminally differentiated B cell subset CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> ( $P = 0.03$ ). The use of antithymocyte globulin (ATG) in preparative conditioning for allogeneic transplants significantly decreased the recovery of naïve CD27-IgM<sup>+</sup> B cells ( $P = 0.037$ ). All other clinical factors assessed on both transplant populations and found non-correlated with B cell mature subsets recoveries are presented as supplemental information in table SI.

Importantly patient's sj-KREC levels at 3 and 6 months evaluation were correlated with the recovery of B cell differentiated subsets after 12 months (table III). In fact, a higher proportion of auto-HSCT patients with sj-KREC levels above the 50<sup>th</sup> percentile of the reference control at 3-month evolution did show recovery of the CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> ( $P = 0.031$ ) when compared with patients that at the same time point did show levels of sj-KRECS lower than the 10<sup>th</sup> percentile of the reference control. The same analysis with levels of sj-KREC at 6 month evolution extends the correlation to an efficient recovery of all B cell mature subsets at the endpoint (CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>,  $P = 0.038$ ; CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>,  $P = 0.0005$ ; CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>,  $P = 0.0028$ ; CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>,  $P = 0.019$  and CD5<sup>-</sup>CD27<sup>++</sup>,  $P = 0.013$ ). The allo-HSCT cohort showed a similar correlation (CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>,  $P = 0.019$ ; CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>,  $P = 0.0024$ ; CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>,  $P = 0.015$ ). Subsequently, we evaluated for a similar relation with early transitional B cells levels and found it not so consistent. The impact was found only in a few mature B cell subsets (table III). Additionally a correlation was found on both auto- and allo-HSCT populations relating the 12 months levels of CD4<sup>+</sup> T cells with the GC educated memory B cell CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> subset recovery ( $P = 0.002$  and  $P = 0.039$  respectively).

#### **4. DISCUSSION**

In this study, the reconstitution of peripheral B cell pool after HSCT was analysed by assessing peripheral B cells that egress from bone marrow and the evolution of B cell subsets levels during 12 months after transplant. The analysis was implemented on

two groups of patients; receiving auto-HSCT and allo-HSCT, either from HLA genotypic related donor or matched unrelated donors. Using a sj-KREC quantification assay that estimates the number of newly produced B cells with origin in the bone marrow [27], our results indicated that B cell neogenesis mechanisms are fully re-established at 3 months post-transplant. After that, the output of marrow newly produced B cells is sustained at or above normal values. Furthermore, we took into account the ratio between excised signal joints and somatic retained coding joints resulting from the allelic and isotypic exclusion of the Ig kappa locus in the peripheral B cells, to estimate peripheral B cells replication history [27]. It was found a low rate of cell divisions at all time points of evaluation, particularly well marked in allo-HSCT group. The low rate of cell proliferation found is an important indicator of engraftment success but also an indication of an arrest of B cell differentiation at late germinal centres.

Our evaluation of peripheral B cell differentiation was directed to a further characterization of the cell compartments  $CD19^+CD5^+$  and  $CD19^+CD5^-$ , the first broadly expanded, the second severely constricted on both groups of patients. The largest  $CD5^+$  expressing human B cell population are transitional cells [29], who represent a critical link between the initial B cell compartment formed in the bone marrow and the mature repertoire shaped on basis of antigen specificity and BCR signalling strength [37]. As  $CD5^+$  B cells with low proliferative, survival and chemotaxis capacities, they were proposed as the stage elements of a peripheral tolerance checkpoint process for deletion of self-reactive B cells [37]. By the analysis of  $CD24$  and  $CD38$  stage expression we found a progressive normalization of compartment from early high levels of transitional T1/T2 cells to T3/pre-naïve phenotype through the first 12 months after transplant. It is unclear the reason for expansion of transitional cells during the B cell compartment reconstitution. On other context such as systemic lupus erythematosus, expansion of transitional cells, was correlated with a derangement of B cell development homeostasis leading to cells in a stage able to contribute to autoimmunity [38,39]. In post-HSCT recovery, expansion of transitional cells seems to be a consequence of an unbalance between bone marrow output of newly produced B cells and an overall arrest of cell maturation, causing an accumulation of cells in the pre-naïve stage. Still, in line with this model and the finding that a robust recover of pre-naïve B cell subset correlate with a successful clinical outcome after HSCT [21,23], our results highlight that early higher sj-KRECs levels are associated with the late recover of mature B cells subsets. Furthermore, in the B cell  $CD5^+$  population we considered the  $CD27^+IgM^+$  phenotype,

conceivably a putative compartment of the controversial *human B-1a like* cells [28,40-42] able to produce polyspecific, natural IgM antibodies [43]. The cell population with that phenotype showed a faster recovery dynamics on auto-HSCT patients compared to the allo-HSCT group but not on the allogeneic transplant group.

The mature B cell compartment CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> composed by differentiated mature naïve and antigen educated memory cells [13], normally accounts for 80.0% (range: 62.0-91.0) of the peripheral B cell pool. Naïve B cells CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup> is the only CD5<sup>-</sup> mature subset most of the patients were able to recover at 12 months evolution. Considering the memory subsets, the recovery of switched memory cells CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> recovery is correlated with high levels of CD4<sup>+</sup> T-cells providers of the co-stimulus on GC reactions necessary to those B cells differentiation [12]. The memory CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> B cell subset showed a delayed recovery and only 25% (17 patients) of auto- and 12% (6 patients) of allo-HSCT patients showed normal values after 12 months evolution. This memory subset recovery showed no correlation with T CD4<sup>+</sup> cell levels supporting the view that a significant proportion of these cells are mainly originated in the splenic marginal zone by T cell independent responses [44,45].

In patients from both groups showing a dynamic reconstitution of B cells, the analysis of IGH repertoire showed no indication of distinct oligoclonal proliferations within the first 12 months after transplantation, but there was higher usage of the small gene families *IGHV2,3* and 6.

This study pinpoints the impairment of mature antigen responsive and educated B cells continuing 12 months after auto- and allo-HSCT. Elderly in the autologous and high grade/chronic GVHD in the allogeneic context are conditions with an impact in lymphopoiesis and consequently in the B cell regeneration. As for the maturation arrest of B cell ontogeny, it is most probably a consequence of a lasting injury caused by the myeloablative agents on anatomical structures where B cell differentiation takes place [46] associated with the lack of a T cell co-stimulatory help due to a severe T CD4<sup>+</sup> lymphopenia common to all patients. A functional hyposplenism has been recognized [47,48], as was the delay of the sequential reconstitution of splenic structures [49] and it is well characterized the thymopoiesis impairment after HSCT [50]. Our analysis of the impending effect of pre- and post-transplant factors recognizes early higher levels of T CD4<sup>+</sup> cells and B cell lymphopoiesis as conceivable indicators of appropriate B cell reconstitution at 12 months evolution.

In conclusion, our study presents a direct insight into the regeneration process of the B cell compartment after the myeloablation inherent of the HSCT procedure. Our

data confirms the existence of a common course followed by both auto-and allo-HSCT, which is driven by an intense B cell neogenesis essential for the restatement of adult B cell ontogeny.

### **Acknowledgements:**

We thank Pedro Venturini (Lisbon Center for Blood and Transplantation, Instituto Português de Sangue e Transplantação) and Cristiana Teixeira (Lisbon Center for Blood and Transplantation, Instituto Português de Sangue e Transplantação) for expert technical assistance and Dr. Luisa Imberti (Inter-departmental AIL Laboratory, Diagnostics Department, Spedali Civili of Brescia, Brescia; Italy) for the kind gift of the triple plasmid construct used for sj-KRECs quantification.

### **References**

- [1] Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010;115:3861–8.
- [2] Small TNT, Keever CAC, Weiner-Fedus SS, Heller GG, O'Reilly RJR, Flomenberg NN. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 1990;76:1647–56.
- [3] Parkkali T, Ruutu T, Stenvik M, Kuronen T, Kayhty H, Hovi T, et al. Loss of protective immunity to polio, diphtheria and Haemophilus influenzae type b after allogeneic bone marrow transplantation. *Apmis* 1996;104:383–8.
- [4] Pauksen KK, Duraj VV, Ljungman PP, Sjölin JJ, Oberg GG, Lönnerholm GG, et al. Immunity to and immunization against measles, rubella and mumps in patients after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1992;9:427–32.
- [5] Haining WN, Evans JW, Seth NP, Callaway GD, Wucherpfennig KW, Nadler LM, et al. Measuring T cell immunity to influenza vaccination in children after haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2004;127:322–5.
- [6] Gokmen E, Bachier C, Raaphorst FM, Muller T, Armstrong D, LeMaistre CF, et al. Ig heavy chain CDR3 size diversities are similar after conventional peripheral blood and ex vivo expanded hematopoietic cell transplants. *Bone Marrow Transplantation* 2001;27:413–24.
- [7] Raaphorst FM. Bone marrow transplantation, fetal B-cell repertoire development, and the mechanism of immune reconstitution. *Blood* 1998;92:4873–4.
- [8] LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570–80.

- [9] Storek J, Witherspoon RP, Storb R. Reconstitution of membrane IgD- (mIgD-) B cells after marrow transplantation lags behind the reconstitution of mIgD+ B cells. *Blood* 1997;89:350–1.
- [10] Cuss AK, Avery DT, Cannons JL, Yu LJ, Nichols KE, Shaw PJ, et al. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J Immunol* 2006;176:1506–16.
- [11] 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. *Clinical Immunology* 2008;127:14–25.
- [12] Greinix HT, Pohlreich D, Kouba M, Körmöczi U, Lohmann I, Feldmann K, et al. Elevated Numbers of Immature/Transitional CD21- B Lymphocytes and Deficiency of Memory CD27+ B Cells Identify Patients with Active Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2008;14:208–19.
- [13] Bemark M, Holmqvist J, Abrahamsson J, Mellgren K. Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clin Exp Immunol* 2011;167:15–25.
- [14] Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immun* 2012;3:302.
- [15] Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381:751–8.
- [16] Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998;188:1679–89.
- [17] Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunology Today* 2000;21:204–6.
- [18] Tangye SGS, Good KLK. Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or “memory” B cells? *J Immunol* 2007;179:13–9.
- [19] Suzuki I, Milner EC, Glas AM, Hufnagle WO, Rao SP, Pfister L, et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage in bone marrow transplant recipients: lack of somatic mutation indicates a maturational arrest. *Blood* 1996;87:1873–80.
- [20] Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2009;15:1143–238.
- [21] Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Cutler CS, Bhuiya NS, Schowalter M,

- et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2009;113:3865–74.
- [22] Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Washel WS, Bhuiya NS, Cutler CS, et al. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2011;117:2275–83.
- [23] Fedoriw Y, Samulski TD, Deal AM, Dunphy CH, Sharf A, Shea TC, et al. Bone Marrow B cell Precursor Number after Allogeneic Stem Cell Transplantation and GVHD Development. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2012;18:968–73.
- [24] Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D. Use of V (D) J recombination excision circles to identify T-and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Transl Med* 2013;11:119.
- [25] Chen X, Barfield R, Benaim E, Leung W, Knowles J, Lawrence D, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood* 2005;105:886–93.
- [26] van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJM. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine* 2007;204:645–55.
- [27] van Zelm MC, Berkowska MA, van der Burg M, van Dongen JJM. Real-time quantitative (RQ-)PCR approach to quantify the contribution of proliferation to B lymphocyte homeostasis. *Methods Mol Biol* 2013;979:133–45.
- [28] Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1285:97–114.
- [29] Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, et al. Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy. *The Journal of Immunology* 2009;182:5982–93.
- [30] Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol* 1992;29:193–203.
- [31] Omazic B, Hentschke P, Nasman-Bjork I, Mattsson J, Oxelius VA, Ringden O, et al. Reconstitution of the Ig Heavy Chain CDR3 Repertoire after Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation with Myeloablative or Reduced-Intensity Conditioning Regimens. *Scand J Immunol* 2005;61:72–81.
- [32] Sloan EM, Mainwaring L, Fuhrer M, Ramkissoon S, Risitano AM, Keyvanfar K, et al. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106:841–51.
- [33] Ault KA. Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *Journal of Experimental Medicine* 1985;161:1483–502.

- [34] Antin JH, Ault KA, Rapoport JM, Smith BR. B lymphocyte reconstitution after human bone marrow transplantation. Leu-1 antigen defines a distinct population of B lymphocytes. *J Clin Invest* 1987;80:325–32.
- [35] Fumoux F, Guigou V, Blaise D, Maraninchi D, Fougereau M, Schiff C. Reconstitution of human immunoglobulin VH repertoire after bone marrow transplantation mimics B-cell ontogeny. *Blood* 1993;81:3153–7.
- [36] Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dörner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest* 1997;99:2488–501.
- [37] Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol* 2003;24:342–8.
- [38] Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and Characterization of a Human CD5+ Pre-Naive B Cell Population. *The Journal of Immunology* 2009;182:4116–26.
- [39] Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2000;165:5970–9.
- [40] Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70. *Journal of Experimental Medicine* 2011;208:67–80.
- [41] Descatoire M, Weill J-C, Reynaud C-A, Weller S. A human equivalent of mouse B-1 cells? *Journal of Experimental Medicine* 2011;208:2563–4.
- [42] Covens K, Verbinnen B, Geukens N, Meyts I, Schuit F, Van Lommel L, et al. Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood* 2013;121:5176–83.
- [43] Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004;197:179–91.
- [44] Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, et al. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004;104:3647–54.
- [45] Krutzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter H-H, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* 2003;197:939–45.
- [46] Avanzini MA, Locatelli F, Santos Dos C, Maccario R, Lenta E, Oliveri M, et al. B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Experimental Hematology* 2005;33:480–6.
- [47] Cuthbert RJ, Iqbal A, Gates A, Toghil PJ, Russell NH. Functional hyposplenism following allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Pathol* 1995;48:257–9.

- [48] Picardi M, Selleri C, Rotoli B. Spleen sizing by ultrasound scan and risk of pneumococcal infection in patients with chronic GVHD: preliminary observations. *Bone Marrow Transplantation* 1999;24:173–7.
- [49] Nakayama A, Hirabayashi N, Ito M, Kasai K, Fujino M, Ohbayashi M, et al. White pulp reconstitution after human bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 1993;143:1111–20.
- [50] Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Seminars in Immunology* 2007;19:318–30.

## Tables

**Table I. Clinical characteristics of patients who underwent autologous and allogeneic HSCT**

	Autologous HSCT		Allogeneic HSCT	
	n	%	n	%
<b>Number Patients</b>	87		62	
<b>Median Age, years (range)</b>	50 (2 to 68)		27 (3 to 66)	
<b>Gender: Male/Female</b>	44/43	50.6 / 49.4	37/25	60/40
<b>Primary Disease/Status at Transplant</b>				
<b>Malignant</b>	87	100	41	66
Complete Remission	44	50.5	35	56.45
Partial Remission	33	37.9	4	6.5
No Response/Progressive	9	10.3	2	3.2
Median line of previous therapy (range)	2.5 (1 to 7)		2.5 (1 to 7)	
<b>Non-malignant</b>	0	0	21	34
<b>Therapy Regimen</b>				
Myeloablative Chemotherapy based	87	100	48	77
Myeloablative Chemotherapy+TBI	0	0	11	18
Submyeloablative Chemotherapy+TBI	0	0	3	5
<b>Graft Characteristics</b>				
Peripheral blood stem cells	87	100	42	68
Bone marrow	0	0	20	32
CD34 <sup>+</sup> /Kg: Median (range) x10 <sup>6</sup>	3.9 (2.0 to 16)		4.1 (0.1- 32.0)	
CD3 <sup>+</sup> /Kg: Median (range) x10 <sup>6</sup>	-	-	15.8 (1.1-46.8)	
Related Donor	-	-	26	42
MUD/full match/1 mismatch*	-	-	36/ 24/ 14	58/39/23
<b>GVHD prophylaxis</b>				
FK506+MTX	-	-	32	52
CsA+MMF	-	-	23	37
FK506+MTX	-	-	3	5
Cort+CsA+MMF	-	-	2	3
FK506+MTX+MMF	-	-	1	2
CsA	-	-	1	2
<b>Clinical Outcomes</b>				
aGVHD grade I-II	-	-	13	21
aGVHD grade IV	-	-	2	3
cGVHD	-	-	4	6
Viral Infections **	13	14.9	44	71
Bacterial infections with agent isolation	30	34.5	34	55
Fungal Infections	19	21.8	27	43.5
<b>Chimerism evaluation 3 months***</b>				
Peripheral blood (n=21)			97 (92-100)	
CD33+ cells (n=41)			99 (100-100)	
CD3+ cells (n=41)			89 (52.8-98.2)	
<b>Chimerism evaluation 10-12 months***</b>				
Peripheral blood (n=19)			99 (80-100)	
CD33+ (n=30)			100 (97-100)	
CD3+ (n=30)			86 (46.7-98.5)	
<b>Primary disease status day +100</b>				
Remission	84	96.6	46	74
Sensitive Relapse	3	3.4	16	26

TBI, total body irradiation; MTX, methotrexate; CsA, cyclosporine; MMF, mycophenolate mofetil, Cort, corticosteroids; MUD, matched unrelated donor; aGVHD, acute graft versus host disease; cGVHD, chronic graft versus host disease. \* HLA mismatches: 7 with one HLA class I allele group mismatch, 5 with one HLA class I allelic mismatch and 2 with one HLA

class II allelic mismatch. \*\* CMV, EBV, BKV and HHV6 infections. \*\*\* Chimerism analysis: donor frequency median (IQR)

**Table II. Analysis of GVHD impact on B cell lymphopoiesis at 6 and 12 months after allogeneic transplantation.**

		noGVHD	aGVHD (I-II)	P	aGVHD(IV)	cGVHD	P*
<b>6 months</b>	<b>n</b>	35	13		2	4	
<b>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup></b>	<b>CD27<sup>-</sup></b>	50.1 (15.3-	35.1 (6.6-		0	0.4 (0.1-4.1)	0.00
	<b>CD27<sup>+</sup></b>	1.3 (0.6-	0.7 (0.2-2.5)	ns	0	0.2 (0.1-0.5)	0.00
	<b>CD27<sup>-</sup></b>	25.8 (6.4-	24.5 (18-75.3)	ns	0	0.7 (0.1-2.6)	0.00
<b>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup></b>	<b>CD27<sup>+</sup>Ig</b>	1.8 (0.66-	1.52 (0.5-4.0)	ns	0	0.5 (0.1-1.0)	0.04
	<b>CD27<sup>+</sup>Ig</b>	1.3 (0.6-	1.9 (0.23-2.5)	ns	0	0.5 (0.1-1.0)	ns
	<b>CD27<sup>++</sup></b>	0.3 (0.05-	0.2 (0.05-0.9)	ns	0	0.1 (0.04-0.4)	ns
	<b>sj-KRECs</b>	37.0 (9.7-	35.5 (8.9-72.4)	ns	0	0.7 (0.5-33.3)	0.04
<b>12 months</b>	<b>n</b>	31	13		0	4	
<b>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup></b>	<b>CD27<sup>-</sup></b>	77.0 (29.1-	60.0 (21.6-	ns	-	13.7 (0.2-44.3)	0.04
	<b>CD27<sup>+</sup></b>	3.9 (0.6-	2.2 (0.7-4.8)	ns	-	1.0 (0.2-4.0)	ns
	<b>CD27<sup>-</sup></b>	35.4 (12.5-	25.6 (18.0-	ns	-	79.9 (0.2-	ns
<b>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup></b>	<b>CD27<sup>+</sup>Ig</b>	3.0 (0.8-	1.9 (0.55-3.9)	ns	-	3.7 (0.2-26.2)	ns
	<b>CD27<sup>+</sup>Ig</b>	4.8 (1.3-	1.6 (0.7-6.2)	ns	-	1.0 (0.1-16.0)	ns
	<b>CD27<sup>++</sup></b>	0.4 (0.01-	0.4 (0.06-1.6)	ns	-	0.5 (0.1-4.6)	ns
	<b>sj-KRECs</b>	30.2 (11.4-	45.0 (7.9-76.6)	ns	-	37.2 (0.34-	ns

noGVHD, GVHD free through 12 months after allo-HSCT; aGVHD(I-II), low grade acute GVHD; aGVHD (IV), high grade IV acute GVHD; cGVHD, chronic GVHD. Values are median (IQR) absolute cell count or sj-KRECs / $\mu$ l blood. \*P-values comparing cell subset cell counts with noGVHD

**Table III. Factors related to the recovery of mature B cell subsets 12 months after autologous and allogeneic HSCT.**

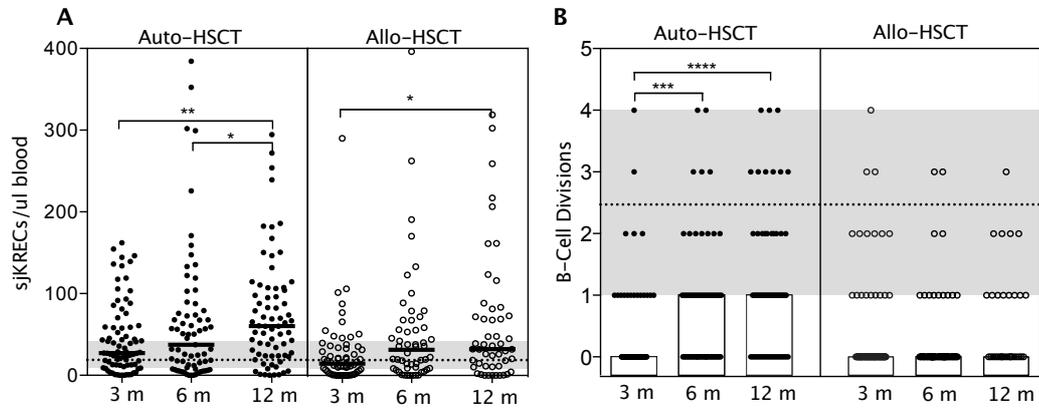
Analysis factors	CD19 <sup>+</sup>			CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup>							
	N	CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>		CD27 <sup>-</sup> IgM <sup>+</sup>		CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>		CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup>		CD27 <sup>++</sup>	
		#	P	#	P	#	P	#	P	#	P
<b>Autologous Tx</b>											
<b>Age</b>											
<18	10	10	Ns	9	ns	9	<0.0001	9	0.004	16	0.03
>55	30	26		20		4	61 (6-617)	11	16.3 (1.8-147)	11	7.2 (1.3-40)
<b>Viral infection</b>											
+	8	5	0.03	5	ns	0	ns	3	ns	0	0.02
-	61	57	0.1 (0.02-0.7)	49		17		33		27	0.1 (0.004-1.3)
<b>Sj-KRECs levels*</b>											
3m >50 <sup>th</sup> P	41	39	0.03	35	ns	14	ns	23	ns	19	ns
3m <10 <sup>th</sup> P	14	10	7.8 (1.2-49)	8		1		6		3	
6m >50 <sup>th</sup> P	41	39	0.03	38	0.0005	16	0.003	25	0.02	22	0.01
6m <10 <sup>th</sup> P	15	11	7.1 (1.1-44)	7	14.5 (3.1-68)	0	20 (1.2-358)	4	4.7 (1.3-17)	2	7.5 (1.5-38)
<b>CD19+CD5+CD27- transitional cell levels*</b>											
3m >50 <sup>th</sup> P	49	47	0.01	42	0.02	15	ns	28	ns	22	ns
3m <10 <sup>th</sup> P	13	9	10.4 (1.7-65.9)	7	5.1 (1.3-19)	1		4		3	
6m >50 <sup>th</sup> P	49	45	Ns	41	0.03	16	ns	27	ns	24	ns
6m <10 <sup>th</sup> P	7	5		3	6.8 (1.3-36)	0		2		0	
<b>12 months CD4+ cell levels**</b>											
CD4+ >50 <sup>th</sup> P	37	35	Ns	33	0.02	11	ns	26	0.01	17	ns
CD4+ <25 <sup>th</sup> P	16	14		8	8.2 (2.0-34)	2		5	5.2 (1.5-18)	3	
<b>Allogeneic Tx</b>											
<b>Conditioning Regimen</b>											
ATG-	22	13	Ns	11	0.04	4	ns	6	ns	5	ns
ATG+	25	19		20	0.2 (0.1-0.9)	2		9		10	
<b>Sj-KRECs levels*</b>											
3m >50 <sup>th</sup> P	20	18	0.002	19	0.006	5	ns	10	0.03	3	ns
3m <10 <sup>th</sup> P	14	5	16 (1.6-100)	5	8.6 (1.8-40)	0		1	10 (1.1-90)	3	
6m >50 <sup>th</sup> P	28	22	0.02	23	0.002	6	ns	13	0.02	12	ns
6m <10 <sup>th</sup> P	15	6	5.5 (1.4-22)	5	9.2 (2.2-39)	0		1	12 (1.4-105)	2	
<b>CD19+CD5+CD27- transitional cell levels*</b>											
3m >50 <sup>th</sup> P	30	24	0.002	23	ns	5	ns	12	ns	12	ns
3m <10 <sup>th</sup> P	14	4	10 (2.3-43)	6		1		2		1	
6m >50 <sup>th</sup> P	30	24	0.03	24	0.01	5	ns	12	ns	11	ns
6m <10 <sup>th</sup> P	19	9	4.4 (1.2-16)	8	5.5 (1.5-20)	1		2		4	
<b>12 months CD4+ cell levels**</b>											
CD4+ >50 <sup>th</sup> P	25	22	0.02	19	ns	6	ns	13	0.04	11	ns
CD4+ <25 <sup>th</sup> P	13	6	8.6 (1.7-44)	8		0		2	6 (1.1-33)	3	

N, total number patients clustered by each analysis factor; # Number of patients with cell count recovery above lower limit of the normal range (>10<sup>th</sup> percentile of control population) at 12 months post-transplant, the difference # to N is the number of patients with no cell recovery (<10<sup>th</sup> percentile of control population); OR, Odds Ratio calculated from 2x2 cross tabs using as variables the number of patients attaining cell subset recovery versus patients with no cell subset recovery as previously defined; ns, Not significant.

\* Patients clustered by sj-KRECs and transitional cell levels <10<sup>th</sup> and >50<sup>th</sup> of normal range (established from control population) at 3 and 6 months post-transplant. \*\* Patients clustered by CD4+ cell counts <25<sup>th</sup> percentile and >50<sup>th</sup> percentile of all patients cell counts distribution at 12 months post-transplant.

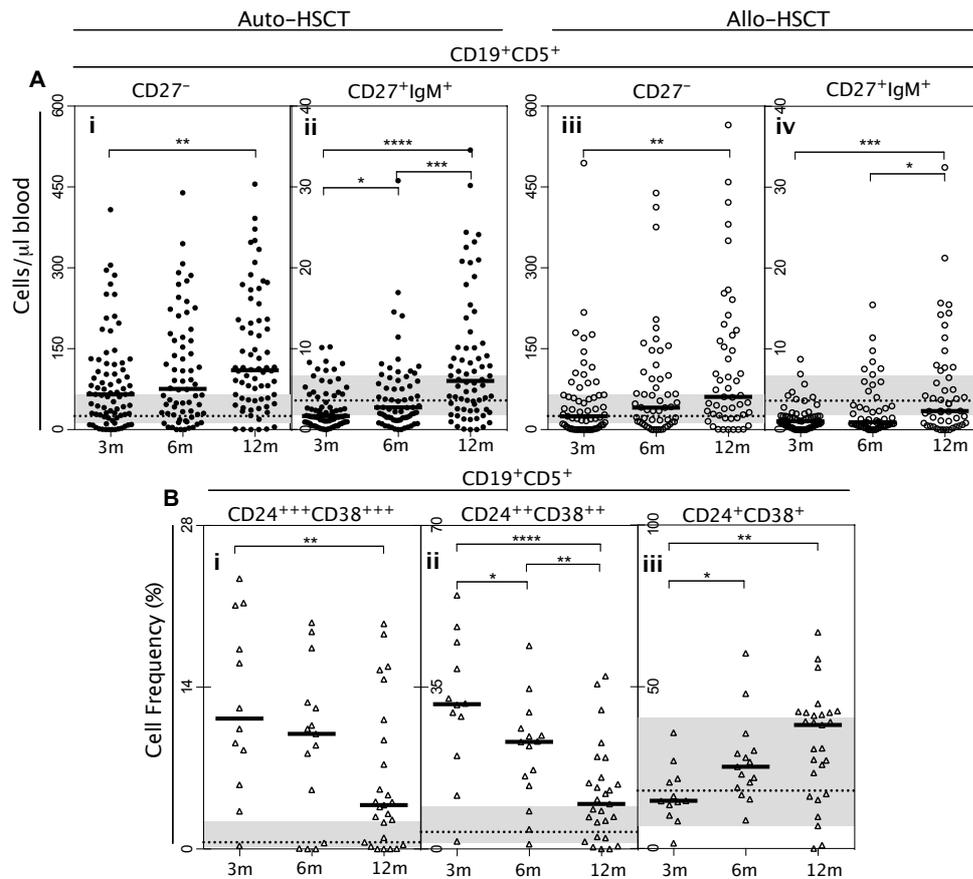
## Figures

Figure 1:



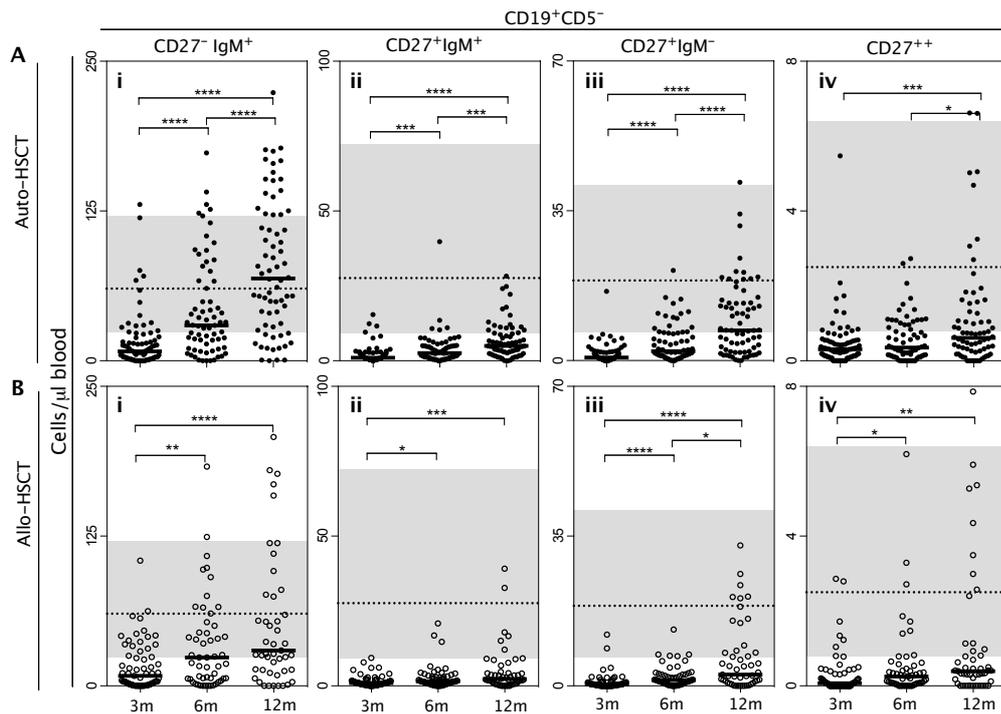
**Figure 1 – Peripheral blood sj-KRECs counts and evaluation of B cell divisions after autologous and allogeneic HSCT.** (A) Serial measurement of sj-KRECs on patients submitted to auto-HSCT (closed dots) and allo-HSCT (open dots) at 3, 6 and 12 months after transplant. (B) Average number of B cell divisions established as the difference of cycle threshold obtained by qPCR amplification of somatic cj-RssKde sequences and sj-KRECS, resulting from kappa-deleting rearrangement, for auto-HSCT and allo-HSCT at the same time points after transplant. Scatter plots of individual data points are displayed and bars or columns indicate medians. Shaded areas are the normal range established from the 10<sup>th</sup>-90<sup>th</sup> percentiles of values observed for the control group and dashed lines are the control median cells count. Significant values between analysis time points found with Mann-Whitney test are indicated. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.5$

**Figure 2:**



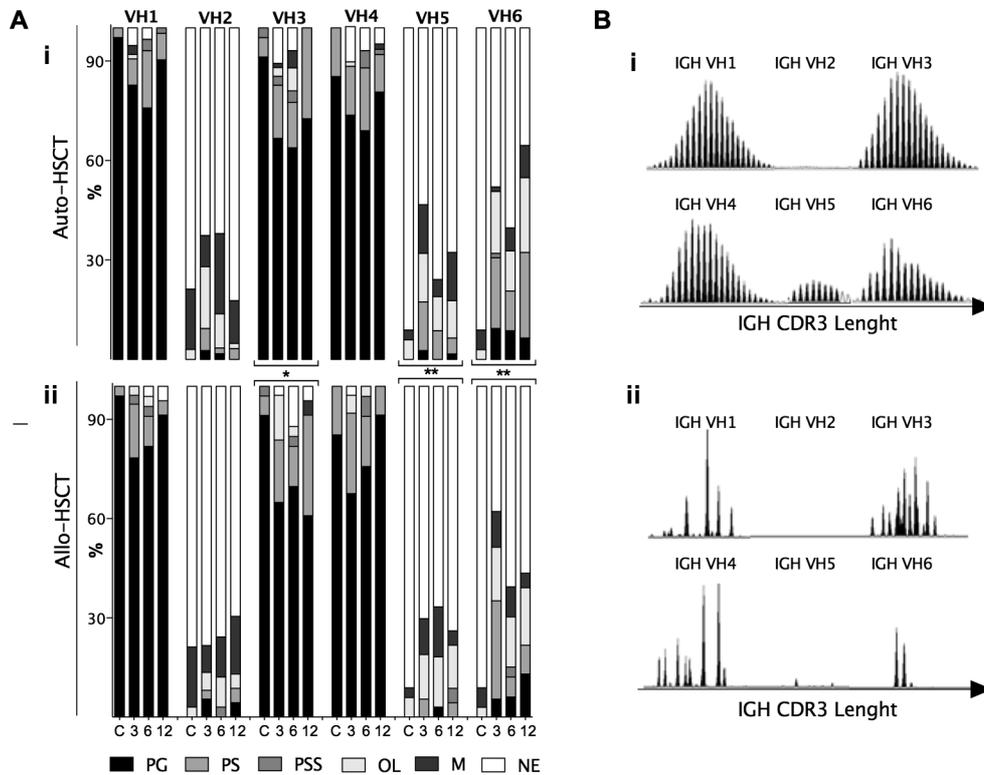
**Figure 2 – Analysis of the CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cell population composition after HSCT.** (A) Cell counts at 3, 6 and 12 months of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> immature cells after auto-HSCT and allo-HSCT (i and iii respectively) and of a fraction expressing CD27 and IgM, probable producers of natural Ig (ii and iv, for auto and allo-HSCT respectively). (B) Proportions of transitional B cell subsets relative to total CD19<sup>+</sup> cells. Subsets were phenotypically defined as CD24<sup>+++</sup>CD38<sup>+++</sup> (T1-stage) (i), CD24<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup> (T2-stage) (ii) and CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (T3/pre-naïve stage) (iii). The post-transplant analysis was performed at 3 months on 12 patients (3 auto-HSCT and 9 allo-HSCT), at 6 months on 15 patients (6 auto and 9 allo-HSCT), and at 12 months on 20 patients (10 auto and 10 allo-HSCT). Individual data points and medians as bars are displayed. Cell subsets normal ranges, depicted from 10<sup>th</sup>-90<sup>th</sup> percentiles controls values are displayed as the shaded areas and dashed lines are the respective medians. Mann-Whitney test was used to compare cell counts and proportions between time points and significant differences are indicated. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

**Figure 3:**



**Figure 3 – Reconstitution of peripheral mature naïve and memory B cell subsets after autologous and allogeneic HSCT .** CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> cell compartment was further defined by differential expression of CD27 and IgM into peripheral B cell mature subsets. (A) Serial measurement of naïve subset (CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>) (i), IgM memory B cells/class able to switch memory subsets (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) (ii), switched memory cells (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) (iii) and the small fraction of circulating plasmablasts (CD27<sup>++</sup>) (iv) of auto-HSCT recovering patients at 3, 6 and 12 months post-transplant. (B) The same subsets cell counts from allogeneic transplant patients (i to iv). Normal ranges displayed as the shaded areas were depicted from 10<sup>th</sup>-90<sup>th</sup> percentiles of controls for each cell subset. Dashed lines are median values from controls. Cell counts recovery was assessed by Mann-Whitney test between time points and significant differences are indicated. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

**Figure 4:**



**Figure 4 – IGH repertoire used on the assembling of IgM transcripts of patients recovering from auto- and allo-HSCT.** (A) Diversity of IgM IGH repertoire on autologous (i) and allogeneic (ii) HSCT patients displayed as profile frequencies of CDR3 spectratypes for *IGHV 1 to 6* gene families. Profiles were classified with basis on peak number, distribution shape and relative fluorescence intensity (RFI) as: polyclonal Gaussian (PG, >15 peaks with a Gaussian distribution), polyclonal skewed (PS, 8 to 15 peaks and non-Gaussian distribution), polyclonal severely skewed (PSS, 8 to 15 peaks with 3 or more gaps and/or 1 peak with RI>40% or 2 peaks with RI>70%), oligoclonal (O, 2 to 7 peaks), monoclonal (M, 1 peak or a peak with RI>90%) and not expressed (NE) as depicted on the legend. First columns of each *IGHV* gene family are the controls profiles distributions followed by profiles found on patients at 3, 6 and 12 months after transplantation. (B) Representative patterns of normal IgM IGH-CDR3 spectratype profile indicative of expression of a diverse repertoire (i) and a skewed repertoire found on patients with a poor B cell recovery. The first profile was characterized as a continuous Gaussian shaped distribution of IGH CDR3 DNA fragments separated by 3 base pairs. The second profile presented dominant peaks and gaps in the distribution indicative of an oligoclonal B cell pool. Differences between control profiles and patients and between analysis time points were assessed with a Fisher exact test. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.001$ .

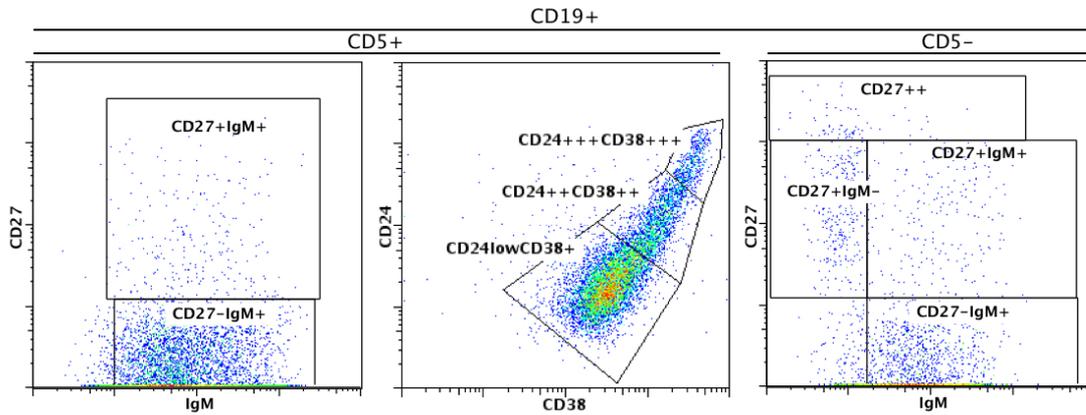
**Table S1 – Analysis of clinical variables in the recovery of mature B cell subsets 12 months after transplant.**

	CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>			CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>		CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>			CD27 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup>		
	N	#	OR	#	OR	#	OR	#	OR	#	OR
			(95%CI)		(95%CI)		(95%CI)		(95%CI)		
<b>Autologous Transplants</b>											
<b>Primary Disease</b>											
B cell	30	26	ns	26	ns	10	ns	18	ns	13	ns
Others	38	35		27		7		17		14	
<b>Graft*</b>											
CD34+/Kg<25 <sup>th</sup>	18	15	ns	13	ns	2	ns	8	ns	1	ns
CD34+/Kg>75 <sup>th</sup>	17	17		13		1		9		6	
<b>Infections</b>											
Bacterial +	23	21	ns	19	ns	5	ns	12	ns	10	ns
Bacterial -	46	41		35		12		24		17	
Fungal +	14	12	ns	11	ns	4	ns	8	ns	3	ns
Fungal -	55	50		43		13		28		21	
<b>12 months CD8+ cell levels**</b>											
CD8+ >50 <sup>th</sup> P	33	30	ns	29	ns	8	ns	18	ns	10	ns
CD8+ <25 <sup>th</sup> P	18	15		13		5		7		8	
<b>12 months NK cell levels**</b>											
NK >50 <sup>th</sup> P	34	33	ns	27	ns	11	ns	20	ns	12	ns
NK <25 <sup>th</sup> P	16	12		11		1		7		4	
<b>Allogeneic Transplants</b>											
<b>Donor</b>											
MUD	28	20	ns	20	ns	2	ns	9	ns	7	ns
Related	21	13		12		4		7		8	
MUD full match	20	13	ns	13	ns	1	ns	7	ns	5	ns
MUD	8	7		7		1		2		2	
<b>Age at Transplant</b>											
≤18	17	14	ns	12	ns	4	ns	7	ns	7	ns
>55	5	3		3		0		2		2	
<b>Conditioning Regimen</b>											
TBI-	37	25	ns	25	ns	5	ns	10	ns	11	ns
TBI+	10	7		6		1		5		4	
<b>Primary disease</b>											
Malignant	32	23	ns	21	ns	3	ns	12	ns	11	ns
Non-malignant	15	9		10		3		3		4	
<b>Graft*</b>											
MO	14	12	ns	11	ns	4	ns	5	ns	7	ns
PBSC	35	21		21		2		11		8	
CD34+<25 <sup>th</sup> P	11	8	ns	7	ns	1	ns	1	ns	3	ns
CD34+>75 <sup>th</sup> P	12	9		8		3		5		4	
CD3+<25 <sup>th</sup> P	9	7	ns	7	ns	1	ns	2	ns	4	ns
CD3+>75 <sup>th</sup> P	13	8		8		0		5		2	
<b>GVHD prophylaxis</b>											
CyA + MTX	21	12	ns	11	ns	3	ns	5	ns	6	ns
FK506 + MTX	28	21		21		3		11		9	
<b>GVHD</b>											
aGVHD IV +	9	5	ns	6	ns	1	ns	1	ns	2	ns
No GVHD	31	23		20		5		12		10	
<b>Infections</b>											
Virus -	16	8	ns	8	ns	2	ns	4	ns	2	ns
Virus +	33	25		24		4		12		13	
Bacterial -	23	14	ns	14	ns	3	ns	7	ns	7	ns
Bacterial +	26	19		18		3		9		8	
Fungal -	35	23	ns	23	ns	2	ns	11	ns	11	ns
Fungal +	14	10	ns	9	ns	4	ns	5	ns	4	ns
<b>12 months CD8+ cell levels**</b>											
CD8+ >50 <sup>th</sup> P	25	19	ns	17	ns	5	ns	11	ns	11	ns
CD8+ <25 <sup>th</sup> P	12	6		7		0		2		2	
<b>12 months NK cell levels**</b>											
NK >50 <sup>th</sup> P	27	21	ns	19	ns	5	ns	11	ns	10	ns
NK <25 <sup>th</sup> P	12	6		7		0		3		4	

N, total number patients in each group; # Number of patients with cell count recovery above lower limit of the normal range (>10<sup>th</sup> percentile of control population) at 12 months post-transplant, the difference # to N is

the number of patients with no cell recovery (<10<sup>th</sup> percentile of control population); OR, Odds Ratio calculated from 2x2 cross tabs using as variables the number of patients attaining cell subset recovery versus patients with no cell subset recovery as previously defined; ns, Not significant. \* groups defined as patients infused with cells counts <25<sup>th</sup> percentile and >75<sup>th</sup> of the overall group. (established from control population) at 3 and 6 months post-transplant. \*\* Patients clustered by CD8+ and NK cell counts <25<sup>th</sup> percentile and >50<sup>th</sup> percentile of normal range distribution at 12 months post-transplant.\*\*\* HLA mismatch: 2 allele group HLA-A, 2 allele group HLA-B, 1 allele group HLA-C, 1 allelic HLA-A, 1 allelic HLA-B and 1 allelic HLA-DR

**Figure 1S**



**Figure 1S - Analysis of peripheral heterogeneity of B cell subsets after HSCT.**

Blood samples were analysed by flow cytometry and lymphocytes were gated based on expression of CD19 and CD5, to identify the B cell CD19+CD5- and CD19+CD5+ fractions, and co-stained for CD27 and IgM. A) CD5 positive B cells were quantified as CD27- (immature transitional/pre-naïve cells) and CD27+IgM+ (putative B-1a like or natural IgM producing cells). B) CD5 positive B cells were further distinguished by the differential expression of CD38 and CD24 into the transitional stages phenotypes CD24+++CD38+++ (T1), CD24++CD38++ (T2) and CD24+CD38+ (T3/pre-naïve). C) CD5 negative B cells were further analysed as the functional subsets CD27-IgM+ (naïve B cells), CD27+IgM+ (memory IgM+ B cells), CD27+IgM- (Ig isotype switched memory cells) and CD27++ (plasmablast cells).