

VÂNIA ABADIA SOARES LINO

**QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T CD8+ CD38+ POR
CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE
INFECÇÃO/REATIVAÇÃO DE CITOMEGALOVÍRUS EM
PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2011**

VÂNIA ABADIA SOARES LINO

**QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T CD8+ CD38+ POR
CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE
INFECÇÃO/REATIVAÇÃO DE CITOMEGALOVÍRUS EM
PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de concentração Propedêutica Complementar - da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia.

ORIENTADORA: Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves

CO-ORIENTADORES: Profa. Silvana Maria Elói Santos
Prof Henrique Neves da Silva
Bittencourt

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Professor Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA: Professora Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Professor Ricardo Santiago Gomez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Professor Francisco José Penna

VICE-DIRETOR: Professor Tarcizo Afonso Nunes

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

COORDENADOR: Professor Wagner Luiz Tafuri

SUB-COORDENADOR: Professor Giovanni Dantas Cassali

MEMBROS DO COLEGIADO

Professor Wagner Luiz Tafuri

Professor Geovanni Dantas Cassali

Professora Rosa Maria Esteves Arantes

Professor Silvana Maria Elói Santos

Professora Helenice Gobb

Professor Marcelo Vidigal Caliar

Izabela Ferreira Amorim (representante discente titular)

Esse trabalho foi desenvolvido no Serviço de Medicina Laboratorial e Serviço de Transplantes de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da professora Suzane Pretti Figueiredo Neves¹ e co-orientação da professora Silvana Maria Elói Santos² e do professor Henrique Neves da Silva Bittencourt.³ Contou com a colaboração de Maria Luiza Silva.⁴

^{1,2} Departamento de Propedêutica Complementar - Faculdade de Medicina - UFMG.

³ Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina - UFMG.

⁴ Laboratório de Citometria de Fluxo – DIP/UFMG

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço à “minha flor” Mariana e ao meu querido esposo Bruno, pela compreensão e incentivo.

Aos meus pais, pela possibilidade da minha formação profissional.

Agradeço à minha cara orientadora, Professora Suzane Pretti Figueiredo Neves, que tem sido minha mentora intelectual, desde a Residência Médica e que “pegou pacientemente na minha mão” para juntas realizarmos este Trabalho.

Aos meus co-orientadores, Professora Silvana Maria Elói Santos e Professor Henrique Neves da Silva Bittencourt, pelos valiosos ensinamentos.

À Maria Luiza e Juliana, pelos ensinamentos, paciência, companheirismo e a grande amizade.

Aos alunos de iniciação científica, Tiago Spizziri e Raquel Bretas, pelo trabalho técnico executado, fundamentais para a conclusão desse projeto.

À Fernanda, pela colaboração nas diversas etapas da confecção deste trabalho.

Ao Serviço de Transplantes de Medula óssea do Hospital das Clínicas da UFMG, na pessoa do Dr Gustavo Machado Teixeira pela grande disponibilidade em contribuir para um conhecimento mínimo dos “nossos pacientes”.

Ao Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial ao Setor de Soroimunologia, pela compreensão da ausência e colaboração.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Ag+	Antigenemia positiva
Ag-	Antigenemia negativa
CD	“Cluster Designation” - grupo de diferenciação
CMV	Citomegalovírus
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DEPE	Diretoria de Ensino e Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FL	Fluorescência
FSC	“Forward scatter” – Dispersão frontal - Tamanho
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
ml	Mililitros
mm ³	Milímetro cúbico
NK	“Natural Killer”
PBS	“Phosphate-buffered saline” - tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PE	Ficoeritrina
SSC	“Side scatter” - Dispersão lateral - Granulosidade
TC	“Tri-Color” – terceira cor
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
μl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Avaliação do percentual das subpopulações de linfócitos T e o percentual de células CD4+CD38+ e CD8+CD38+ em células do sangue periférico utilizando a estratégia de análise convencional. O primeiro passo constitui na seleção da população celular de interesse em gráficos de distribuição puntual de tamanho-FSC *versus* granulosidade-SSC. Após a seleção da região de interesse – R1, o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, pode ser identificado em gráficos bidimensionais de distribuição puntual da fluorescência 1 (FL1) *versus* fluorescência 2 (FL2) e FL2 *versus* FL329
- FIGURA 2 - Análise da expressão de CD16 e de CD56 em leucócitos do sangue periférico. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) foram construídos gráficos de *dot plots* de FL1/CD3 onde duas novas regiões R2 e R3 foram construídas, confinando as populações de interesse. As regiões R1 e R2 foram combinadas e em seguida um gráfico *dot plots* de FL2/CD56 x FL3/CD16 contendo as células presentes em G2, foi utilizado para quantificar a frequência de células CD16 e CD56 positivas para a população de linfócitos CD3 negativos30
- FIGURA 3 - Análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência da expressão de FcγR3 (CD16) e de HLADR na população de monócitos. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos, através de gráficos de distribuição puntual de FL1/CD14 *versus* granulosidade (SSC) foram construídos histogramas de FL3/CD16 e FL2/DR para a identificação da intensidade média de fluorescência para cada marcador fenotípico analisado na população de monócitos31
- FIGURA 4 - Percentuais de linfócitos T expressando CD38 e HLA-DR37
- FIGURA 5 - Correlação (r) entre expressão de HLADR e CD38 em linfócitos CD4 e CD8.....38

LISTA DAS TABELAS

TABELA 1 - Características clínicas dos pacientes submetidos ao TCTH	24
TABELA 2 - Positivização da antigenemia em pacientes pós TCTH	25
TABELA 3 - Anticorpos monoclonais utilizados para realização da imunofenotipagem	28
TABELA 4 - Protocolo de seqüência de tubos utilizados para realização de imunofenotipagem	28
TABELA 5 - Evolução dos pacientes submetidos ao alo-TCTH (n=15).....	34
TABELA 6 - Percentuais de expressão de marcadores em linfócitos e monócitos - D+30	40
TABELA 7 - Percentuais de expressão de marcadores em linfócitos e monócitos - D+60	40

RESUMO

Introdução: A infecção/reativação por citomegalovírus (CMV) é uma das principais causas de morbi/mortalidade em pacientes imunossuprimidos. Já foi observado em pacientes transplantados de rim e fígado, que este processo é acompanhado de aumento significativo de linfócitos T CD8+CD38+ circulantes. Em pacientes que receberam Transplante de Células Tronco-Hematopoiéticas (TCTH) não há relatos que abordem o estudo desta subpopulação na vigilância/diagnóstico da doença por CMV. **Objetivos:** Este estudo pretendeu avaliar marcadores de ativação celular em linfócitos T circulantes (CD38 e HLA-DR), por citometria de fluxo, em pacientes submetidos ao TCTH e sua correlação com a infecção/reativação por CMV. **Métodos:** Amostras de sangue de 15 pacientes submetidos ao TCTH foram analisadas, por citometria de fluxo, utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD38, anti-HLADR e os resultados comparados com a antigenemia para CMV, realizada por imunofluorescência indireta. Utilizou-se o programa Minitab for Windows para as análises estatísticas e o valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo. **Resultados:** Os pacientes com antigenemia positiva não apresentaram aumento significativo nos percentuais de linfócitos TCD8+ expressando os marcadores de ativação celular CD38 e HLADR, quando comparados com os pacientes com antigenemia negativa. Surpreendentemente, observou-se que ambos os grupos apresentaram percentuais extremamente elevados de linfócitos ativados, independente da presença de doença por CMV. **Conclusão** Este estudo sugere que, em pacientes submetidos ao TCTH, o estudo de sub-populações linfocitárias circulantes ativadas não parece contribuir para a identificação precoce da doença por CMV.

Palavras-chave: transplante de medula óssea, citomegalovírus, citometria de fluxo, antígeno CD38.

ABSTRACT

Background: Infection/reactivation Cytomegalovirus (CMV) is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised hosts. It has already been observed in patients that have undergone kidney or liver transplantation, that CMV disease is accompanied by significant increase of circulating CD8+CD38+ T lymphocytes. In patients that received haematopoietic stem-cells (HSCT), there are no reports that address the study of this subpopulation in monitoring/diagnosis of CMV disease.

Objectives: This study aimed to evaluate some cellular activation markers on circulating T lymphocytes (CD38 and HLA-DR), by flow cytometry, in patients undergoing HSCT and to establish its correlation with CMV disease. **Methods:** Blood samples of 15 patients undergoing HSCT were analysed by flow cytometry, using the following monoclonal antibodies: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD38, anti-HLA-DR, and the results were compared to CMV antigenemia, held by indirect immunofluorescence. Minitab for Windows was used for statistical analysis and a p-value < 0.05 was considered significant. **Results:** Patients with positive antigenemia did not show any significant increase in the percentages of T CD8+cells expressing the activation markers CD38 or HLADR when compared to patients with negative antigenemia. On the contrary, all patients showed high percentages of these cells independent of the presence of CMV disease. **Conclusions:** This study suggests that, in patients undergoing HSCT, the study of these lymphocyte sub-populations doesn't seem to contribute to the early identification of the CMV disease.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation, cytomegalovirus, flow cytometry, antigen CD38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 O transplante de células- tronco hematopoiéticas	14
1.2 A reconstituição do sistema imune após o TCTH.....	15
1.3 A infecção pelo citomegalovírus	16
1.4 O Diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV	18
1.5 A citometria de fluxo e seu uso na vigilância/diagnóstico da infecção pelo CMV	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Pacientes.....	23
3.2 Obtenção de amostras	25
3.3 Antigenemia para CMV.....	25
3.4 Imunofenotipagem de leucócitos de sangue periférico.....	27
3.5 Estratégias de análises dos resultados	28
3.5.1 Análise convencional	29
3.5.2 Análise combinada “gated”	30
3.5.3 Análise semiquantitativa da expressão de FcγR em monócitos..	31
3.6 Estudo estatístico.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Evolução dos pacientes durante o estudo	33
4.2 Quantificação de linfócitos T CD4 expressando CD38	36
4.3 Quantificação de linfócitos T CD8 expressando CD38.....	36
4.4 Quantificação de linfócitos T CD4 expressando HLA-DR	36
4.5 Quantificação de linfócitos T CD8 expressando HLA-DR	36
4.6 Correlação entre expressão de HLADR e CD38 em linfócitos CD4 e CD8.....	38

4.7 Expressão dos demais marcadores em linfócitos e monócitos	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO I -Termo de consentimento livre e esclarecido.....	54
ANEXO II – Artigo.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 O transplante de células- tronco hematopoiéticas

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico é indicado como medida terapêutica para diversas neoplasias hematológicas, insuficiências medulares, doenças imunológicas e distúrbios congênitos da hematopoiese (DOMINIETTO et al., 2001; HUUGEN et al., 2002; LUM,1987; WOO et al., 1997). É um procedimento clínico que consiste na infusão, por via endovenosa, de células tronco-hematopoiéticas obtidas de um doador, previamente selecionado, em um receptor adequadamente condicionado (LANZKRON et al., 1999; WOO et al., 1997).

O TCTH pode ser classificado de acordo com o tipo de doador em alogênico - realizado entre indivíduos diferentes; autólogo - quando são utilizadas células-tronco hematopoiéticas do próprio paciente; singênico - quando ocorre entre indivíduos genotipicamente idênticos. Quanto à semelhança do HLA do paciente e do doador, o TCTH pode ser dividido em compatível, quando há semelhança entre antígenos de histocompatibilidade do doador e do receptor; e incompatível, quando existem diferenças entre antígenos de histocompatibilidade do doador e receptor. Quanto à fonte de células-tronco hematopoiéticas utilizadas, o TCTH pode ser classificado em transplante de medula óssea, quando as células progenitoras são aspiradas da medula óssea da crista ílica; transplante de células tronco periféricas, quando as células progenitoras são obtidas por aférese do sangue periférico e transplante de cordão umbilical, quando a aspiração de células tronco ocorre na veia umbilical do doador (AMOS; GORDON, 1995).

Previamente ao transplante, o paciente é submetido a um regime de condicionamento com altas doses de quimioterapia associada ou não a irradiação corpórea total, preparando-o assim para receber o enxerto, com o objetivo de repopulação da sua medula óssea, reiniciando a atividade do sistema imunológico e hematopoiético. O condicionamento varia com a doença de base do paciente. Em pacientes com doenças não malignas, é direcionado à imunossupressão, ao passo que, para pacientes portadores de doenças malignas o regime condicionante associa drogas citotóxicas para destruição das células malignas a drogas

imunossupressoras (DAHLLÖF et al., 1997; KRENGER; HOLLÄNDER, 2010; LACERDA, 2004).

O TCTH alogênico é um procedimento que apresenta diversas complicações com elevadas taxas de morbidade e mortalidade (BOSI et al., 2005; LUM, 1987). Estas complicações podem ser devidas aos efeitos tóxicos do regime condicionante, às conseqüências da mielossupressão e/ou ao aparecimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). A DECH é uma síndrome sistêmica que acomete pacientes transplantados, causada pela reação dos linfócitos imunocompetentes do enxerto que reconhecem e atacam o tecido do hospedeiro (CHAO et al., 2006; SPARKES; SPARKES, 1978; SVILAND et al., 2001; WOO et al., 1997). O regime condicionante pode levar ao desenvolvimento de mucosites, sangramentos, xerostomia e disgeusia. Com a imunossupressão, estes pacientes tornam-se susceptíveis a diversas infecções ou reativação de infecções latentes. Dentre estes, o CMV é o principal patógeno associado à infecção viral no paciente no período pós transplante, sendo a causa mais freqüente de infecção no primeiro mês após o procedimento (MEYERS, 1986; NEVES; CLEMENTE, 2009), e a principal causa de morbidade e mortalidade entre as infecções virais pós TCTH nestes indivíduos (BONON et al., 2006; DETRICK et al., 1999).

1.2 A reconstituição do sistema imune após o TCTH

A reconstituição imunológica após o TCTH depende de vários fatores e pode levar um a dois anos após o transplante. A idade do receptor parece estar inversamente associada ao grau de imunocompetência pós transplante. Tal fenômeno pode ter relação com o grau de involução do timo na idade adulta. O grau de parentesco e a compatibilidade HLA entre doador e receptor também podem desempenhar um papel relevante na reconstituição imunológica pós-transplante. Assim, os receptores de enxertos alogênicos e/ou não compatíveis podem ter uma imunodeficiência profunda até mais de um ano pós-transplante. Além desses, a fonte das células tronco, a doença de base, o regime de condicionamento utilizado, o tipo de imunossupressão e a presença de DECH - também influenciam na reconstituição do sistema imune do receptor (GEDDES; STOREK, 2007; LACERDA, 2004; LUM, 1987). Após o transplante, a reconstituição da medula óssea consiste na

recuperação numérica dos elementos celulares e na recuperação funcional das interações celulares (REIS; VISENTAINER, 2004).

Em relação à imunidade inata, a recuperação da contagem de neutrófilos após o TCTH é rápida, verificando-se dentro de até 20 dias após o transplante. (GEDDES; STOREK, 2007; LACERDA, 2004; LUM, 1987; WILLIAMS; GRESS, 2008). Em contraste com as células da imunidade inata, a reconstituição linfóide adaptativa é retardada. As contagens de linfócitos T e B demoram mais para se recuperar e a atividade funcional dessas células permanece suprimida por um período maior de tempo (HAKIM et al., 1997; REIS, 2004; STOREK et al., 1993; WILLIAMS; GRESS, 2008). Nos primeiros meses pós-transplante, o repertório imune adaptativo é dominado por células que provêm da expansão periférica de células T de memória tanto do doador como de algumas células remanescentes do receptor, posto que a geração de novas células T via timopoiese é deficiente devido ao condicionamento, irradiação e imunossupressão (HAKIM et al., 1997; STOREK et al., 1993; WILLIAMS et al., 2007). A reconstituição numérica de células T nesta fase inicial pós transplante é lenta, verificando-se, em número absoluto, contagens inferiores a 200 células/ μ l de CD4+ e CD8+ até os três meses pós-transplante. Em regra, a recuperação de células CD8+ é mais rápida do que a de células CD4+ (BOECKH et al., 2003; GEDDES; STOREK, 2007; WILLIAMS et al., 2007). A reconstituição da função linfocitária T é fundamental para o desenvolvimento de respostas imunitárias secundárias no período pós-transplante. (BOECKH et al., 2003; BUXBAUM et al., 2006; GEDDES; STOREK, 2007; WILLIAMS et al., 2007).

Em relação aos linfócitos B, seu número é baixo nos primeiros dois meses pós-transplante, podendo ser indetectável; esta contagem aumenta gradativamente por um a dois anos após o transplante. (GEDDES; STOREK, 2007; LACERDA, 2004; MARTINEZ et al., 1999; STOREK et al., 1993; WILLIAMS; GRESS, 2008).

1.3 A infecção pelo citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é um vírus pertencente à família *Herpesviridae* formado por uma molécula de DNA de fita dupla. Apresenta um nucleocapsídeo icosaédrico circundado por uma camada protéica definida como tegumento ou matriz. As proteínas que constituem o tegumento apresentam alta imunogenicidade. Como todos os herpes vírus, o CMV tem a capacidade de ficar latente no organismo

humano reativando-se na vigência de imunossupressão (CUMPRACKER et al., 2005; GERNA et al., 1996; HAYASHI et al., 2000). Células polimorfonucleares, linfócitos T, endotélio, células epiteliais renais e glândulas salivares podem abrigar o CMV sem replicação ou em replicação lenta. A infecção pelo CMV pode ser primária - quando acomete um indivíduo soronegativo, que nunca foi infectado pelo CMV- ou secundária – reativação de uma infecção latente ou reinfecção em um paciente soropositivo (CUMPRACKER et al., 2005). A soro-prevalência do CMV na população mundial é alta, cerca de 80% dos indivíduos já contraíram o vírus. No Brasil esse índice é ainda maior, aproximadamente 95% dos indivíduos adultos já contraíram o vírus (CUNHA et al., 2002).

Embora possa ocorrer a infecção primária, habitualmente resultado de uma doação de indivíduo soropositivo para um receptor soronegativo, a maioria das infecções pelo CMV no paciente pós TCTH deve-se à reativação de uma infecção latente, principalmente no período até três a sete meses após o transplante. Aproximadamente 70% dos receptores de TCTH são CMV-soropositivos e/ou receberão transplante de doador CMV-soropositivo (BOECKH et al., 2003; HEBART et al., 2000; LILLERI et al., 2008). A reativação ocorre em até 60-70% dos pacientes após o transplante, podendo causar grave pneumonia intersticial, hepatite, comprometimento de todo o trato gastrointestinal (esôfago ao cólon), do sistema nervoso central e ainda retinite (BOECKH et al., 2003; COURIEL et al., 1996; LACEY et al., 2003; NUCCI; MAIOLINO, 2000; OZEDEMIR et al., 2002). Além dos efeitos diretos da lesão tecidual pelo CMV, aqueles indiretos como rejeição aguda e crônica, alterações vasculares oclusivas do enxerto, doença linfoproliferativa e superinfecção bacteriana, fúngica e viral, elevam consideravelmente a morbidade pós transplante (BUXMAN et al., 2006; NEVES et al., 2009). Na ausência de profilaxia ou tratamento quimioterápico, aproximadamente um em cada cinco pacientes submetidos ao TCTH desenvolvem pneumonia por CMV após o transplante (MEYERS, 1986). Entretanto, a instituição de tratamento eficaz contra o CMV torna-se possível com o diagnóstico laboratorial precoce, baseado no diagnóstico laboratorial. Por isso, testes laboratoriais rápidos, específicos e sensíveis para detectar a doença por CMV são importantes para a instituição da terapia antes do início dos sintomas clínicos e apresentam grande impacto na sobrevida do paciente (BALDANTI et al., 2008; BOECKH et al., 2003; BORISKIN et al., 2002). Nos últimos anos houve importantes avanços nas estratégias profiláticas

antivirais e no desenvolvimento de métodos diagnósticos sensíveis para monitorar os receptores de TCTH (CROUGH; KHANNA, 2009; HEBART et al., 2000; MOTTA; MARTINS, 2008). Na prática clínica são adotadas três modalidades terapêuticas para prevenir e tratar infecção e doença por CMV. Essas três modalidades terapêuticas incluem o tratamento da doença estabelecida, a profilaxia universal, e a terapia guiada ou preemptiva. A profilaxia universal consiste em administrar a terapia antiviral em todos os pacientes com risco de reativação do CMV. Na terapia guiada ou preemptiva, a administração da droga antiviral é realizada apenas em pacientes com reativação viral, detectada por marcadores específicos e sensíveis que diagnosticam precocemente a infecção pelo vírus (BOECKH et al., 2003; BONON et al., 2005; MOTTA; MARTINS, 2008; RUBIN, 1991).

1.4 O Diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV

O diagnóstico de infecção e de reativação do CMV pode ser feito por demonstração do vírus ou seus efeitos nos tecidos - isolamento do vírus por cultura de células, reações de imunohistoquímica e hibridização *in situ*; pesquisa de antígenos virais - detecção de antígenos do CMV em leucócitos circulantes (antigenemia) ou pesquisa do genoma viral – detecção quantitativa de ácidos nucléicos virais por reação em cadeia da polimerase – (PCR) ou PCR em tempo real (PCR *real time*). A antigenemia é baseada na marcação da proteína pp65 do CMV no núcleo dos neutrófilos, o que acontece nos períodos de replicação viral, portanto, um resultado positivo é compatível com infecção/reactivação por CMV. A pesquisa de anticorpos pode ser utilizada para detecção de infecção primária (IgM+/IgG-) no pós transplante e/ou para avaliar contato prévio do paciente com o vírus (IgG+/IgM-).

Os exames laboratoriais mais utilizados na rotina para o diagnóstico da reativação do CMV são a demonstração de antígenos virais pela antigenemia e a detecção de ácidos nucléicos virais por PCR *real time*, que determina quantitativamente a viremia (BALDANTI et al., 2008; GAULT et al., 2001; LI et al., 2003; NEVES et al., 2009; PIIPARINEN et al., 2001; YAN; FEDORKO, 2002).

Em situações onde os métodos moleculares não estão disponíveis, a antigenemia tem sido usada para monitorar a infecção/reactivação do CMV em pacientes pós TCTH e para guiar a terapia antiviral. Porém, apresenta baixa sensibilidade, principalmente no período antes da pega do enxerto, devido ao baixo

número de leucócitos no sangue desses pacientes (BOECKH et al., 1997; CROUGH; KHANNA, 2009). Os métodos moleculares de amplificação do DNA do CMV, como a PCR em tempo real, apresentam maior sensibilidade e especificidade para definir níveis virais que podem estar relacionados com infecção/ reativação do vírus (BOECKH et al., 1997; KANO; SHIOHARA, 2000; LI et al., 2003). Entretanto, são técnicas de alto custo e ainda restritas a laboratórios de alta complexidade. Por outro lado, a antigenemia é trabalhosa, demorada e também de custo elevado.

Neste contexto, a citometria de fluxo é uma técnica com grandes vantagens: mínima manipulação de uma grande quantidade de células, sendo um método bastante utilizado para definição de populações celulares de interesse através da imunofenotipagem, relativamente rápida, mais barata que a PCR ou antigenemia. (ABBAS; LICHTMAN, 2005; D'HAUTCOURT et al., 1997).

1.5 A citometria de fluxo e seu uso na vigilância/diagnóstico da infecção pelo CMV

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica que possibilita a caracterização fenotípica de células em suspensão, pela análise da expressão de diferentes moléculas na superfície e interior das células. Através dela é possível determinar a linhagem celular, estágio de maturação ou *status* de ativação das mesmas. Essa técnica é usualmente executada corando-se a célula com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, que são específicos para aquelas moléculas e medindo-se a quantidade de fluorescência emitida pela célula. (ABBAS; LICHTMAN, 2005; D'HAUTCOURT et al., 1997).

A contribuição da imunofenotipagem por citometria de fluxo, no monitoramento de algumas infecções já foi demonstrada em vários estudos. Em infecções pelo vírus HIV, a quantificação de linfócitos T CD8+CD38+, associada à contagem de células T CD4+, tem sido usada para prever a progressão da doença. Uma expressão aumentada de CD38 na população T citotóxica indica ativação do sistema e maior progressão para AIDS (LIU et al., 1997; SUKWIT et al., 2005). Em outras viroses, o estudo desta subpopulação T CD8+/CD38+, tem sido utilizado para fins diagnósticos com resultados promissores. Foi demonstrado na mononucleose por Epstein-Barr vírus e CMV um aumento significativo no número de moléculas

CD38 expressas em linfócitos T CD8+, quando comparados com controles sadios (ZIDOVEC et al., 2003).

De fato, em adultos, a ativação imune correlaciona-se com um aumento na expressão do marcador CD38 em células T CD4+ e T CD8+ (FERRERO et al., 2000; HERTOGHS et al., 2010; LIU et al., 1997). Esta molécula definida, inicialmente, por Reinherg e Scholossman em 1980, é uma glicoproteína transmembrana tipo II com atividade enzimática (ecto-NADase), expressa em linfócitos, macrófagos, células endoteliais, células dendríticas e diversos outros tipos celulares. É também expressa em células hematopoiéticas precoces, sendo perdida durante a maturação celular e re-expressa durante períodos de ativação. Assim, recém-nascidos expressam altos níveis de CD38 em suas células T que decaem com a idade. Em crianças, cerca de 75% das células T CD4⁺ e 50% das células T CD8⁺ expressam CD38 normalmente. (BOFILL et al., 2000; FERRERO; MALAVASI, 1999; McCLOSKEY et al., 1997; SHERMAN et al., 2002).

Uma outra molécula que tem sua expressão aumentada em linfócitos T após eventos de ativação imune é o antígeno do MHC de classe II, HLA-DR, sejam estes eventos induzidos por processos patológicos ou por imunização (CARUSO et al. 1997; KO et al., 1979; LENKEI; ANDERSSON, 1995). O aumento na expressão de HLA-DR nas células T tem sido proposto, em alguns estudos, como marcador de progressão da infecção por HIV-1, tanto em adultos quanto em crianças (LIU et al., 1997; ROSENBLATT et al., 2005).

Em pacientes transplantados, a pesquisa de linfócitos T CD8+CD38+ mostrou-se um parâmetro imune altamente sensível (100%) e específico (91%) para indicar infecção primária ativa por CMV em pacientes receptores de transplante renal. Em todos os casos de infecção primária ou reativação por CMV, percentuais > 20% de linfócitos T CD8+CD38+ foram observados precocemente, junto com os primeiros sinais de infecção ou dias antes do início desses. Isto possibilitou o início precoce do tratamento, evitando a evolução para doença severa e favoreceu a redução do custo final do transplante (BELLES-ISLES et al., 1998). A expressão aumentada de CD38 em linfócitos T CD8+ foi um marcador de infecção ativa por CMV ou reativação, nos pacientes pós transplante hepático, sugerindo que a monitorização deste marcador pode fornecer importantes informações sobre o risco e desenvolvimento da doença por CMV nos pacientes recém transplantados (BENZ et al., 2002; WANG et al., 2006).

Em pacientes que receberam TCTH, não há relatos que abordem o estudo das subpopulações T CD38+ e HLA-DR+, na vigilância/diagnóstico da doença por CMV. Sendo assim, o estudo destes marcadores de ativação celular em células do sangue periférico pode revelar uma nova estratégia diagnóstica em situações onde nem a antigenemia, nem as metodologias moleculares estão disponíveis, auxiliando assim na instituição precoce do tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar marcadores de ativação celular em linfócitos circulantes, por citometria de fluxo, em pacientes submetidos ao TCTH e sua correlação com a doença por CMV.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar marcadores de ativação celular - CD38 e HLA-DR – nas subpopulações linfocitárias T CD4 e T CD8 circulantes, por citometria de fluxo, em pacientes submetidos ao TCTH e sua correlação com a doença por CMV.
- 2- Avaliar as demais populações de linfócitos, monócitos e *natural killer* (NK) circulantes, no mesmo grupo de pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP (parecer número ETIC 543/07).

Foram estudados 15 pacientes submetidos ao TCTH no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), no período de novembro de 2007 a maio de 2010. Como critérios de elegibilidade para inclusão de casos no estudo foram selecionados pacientes submetidos ao TCTH alogênico, de ambos os sexos, de qualquer idade, sem distinção de grupo social (TAB. 1). Os pacientes foram condicionados para TCTH de acordo com o protocolo para transplante alogênico da Unidade de Transplante do HC-UFMG. A profilaxia da DECH foi realizada com ciclosporina em combinação com metotrexate ou micofenolato mofetil. Metilprednisolona foi utilizada no tratamento da DECH. Todos os pacientes receberam também aciclovir, bactrim e fluconazol como profilaxia de infecções. A antigenemia foi realizada semanalmente do dia +30 até o dia +100 pós TCTH em todos os pacientes, conforme protocolo da Unidade de Transplantes. Para o estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o resultado da antigenemia (positiva ou negativa), sendo que aqueles com antigenemia negativa foram considerados como grupo controle. Ambos os grupos foram estudados em dois momentos: no dia +30 e no dia +60 após o transplante. Este período foi determinado após análise retrospectiva dos resultados de antigenemia para CMV em onze pacientes antes do início deste estudo (TAB. 2).

TABELA 1

Características clínicas dos pacientes submetidos ao alo-TCTH (n=15)

Mediana – idade (anos)	39 (15-53)
Diagnóstico de base:	
Aplasia Medular	4
Leucemia linfoblástica aguda	3
Leucemia mielóide crônica	4
Outros ^a	4
Fonte de células tronco	
Medula óssea	8
Sangue periférico	7
HLA – Compatibilidade	
Aparentado	14
Não-aparentado	1
CMV Status sorológico receptor/doador-CMV-IgG	
Positivo / Positivo	12
Positivo / Negativo	1
Negativo / Negativo	0
Negativo / Positivo	2

^a Leucemia mielóide aguda (1), mielodisplasia (1), mieloma múltiplo (1) e mielofibrose (1)

TABELA 2
Positivização da antigenemia em pacientes pós - TCTH

Paciente	Data TCTH	Data positividade da antigenemia	Tempo (dias)
1	24/11/05	06/01/06	43
2	05/12/05	13/01/06	39
3	09/12/05	13/01/06	35
4	20/04/06	06/06/06	47
5	29/04/06	26/06/06	58
6	13/07/06	08/08/06	26
7	12/07/06	10/08/06	29
8	27/07/06	08/09/06	43
9	03/08/06	06/10/06	64
10	06/09/06	17/10/06	41
11	13/09/06	31/10/06	48

3.2 Obtenção de amostras

Amostras de sangue foram coletadas, por punção venosa através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer, Greiner, Brasil) em um tubo de 4ml, contendo EDTA, após assinatura do Termo de Consentimento Informado e Esclarecido aprovado pelos Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO 1). O sangue foi utilizado para antigenemia de CMV e o restante do material não aproveitado na antigenemia (2ml) foi utilizado para estudo do perfil imunofenotípico de linfócitos circulantes.

3.3 Antigenemia para CMV

A amostra foi mantida à temperatura ambiente até a separação das células, o que foi feito até no máximo 6 a 8 horas após a coleta. Para realização do exame foi utilizado o Kit CMV Brite Turbo (IQ Products, the Netherlands). Utilizou-se como reagentes: reagente A - solução de lise de eritrócitos; B - solução fixadora; C -

solução permeabilizadora; D - coquetel anti-pp65 (anticorpos monoclonais contra a proteína pp65 do CMV); E – conjugado (imunoglobulina ligada a o fluorocromo).

O preparo da suspensão de leucócitos foi realizado com diluição do reagente A 1:10 em água destilada que foi colocada na geladeira; foram misturados 2ml de sangue com 30ml de solução de lise gelada num tubo cônico de 50ml e colocado na geladeira por cinco minutos; esta mistura foi centrifugada a 2.500 rpm por dois minutos e o sobrenadante descartado; o *pellet* celular foi ressuspensionado em 30ml de PBS, centrifugado a 2.500rpm por dois minutos e descartado o sobrenadante; o *pellet* foi ressuspensionado novamente em 1ml de PBS. As células foram contadas em um contador hematológico, ajustando a concentração para 2×10^6 células/ml. Os esfregaços foram preparados através da centrifugação de 100 μ l da suspensão de células em citocentrífuga, a 600rpm por quatro minutos, sendo preparadas duas lâminas para cada paciente; estas foram secas por cinco minutos e os esfregaços marcados. A fixação e permeabilização foram feitas através da diluição da solução fixadora B a 1:5 em PBS e da solução permeabilizadora A 1:5 em PBS, colocando as lâminas na solução fixadora por cinco minutos à temperatura ambiente e mergulhando-as em PBS três vezes, deixando nesta solução por três minutos e, após, na solução permeabilizadora por um minuto à temperatura ambiente. As lâminas foram mergulhadas em PBS três vezes e depois colocadas por mais cinco minutos em PBS fresco, deixando secar por 20 minutos sob um ventilador. As lâminas poderiam ser mantidas a 4°C por 24 horas, envolvidas em papel alumínio ou congeladas a – 80°C ou coradas imediatamente. Para a coloração fluorescente das lâminas previamente fixadas foi feita a rehidratação das mesmas por um a dois minutos em PBS; se congeladas, foram descongeladas à temperatura ambiente e após re-hidratadas em PBS. Em seguida foram adicionados 35 μ l do anticorpo monoclonal anti-pp65 a cada esfregaço, incubando a 37°C numa câmara úmida por 20 minutos e, então, mergulhadas em PBS três vezes, na última vez deixando-as nesta solução por três minutos. Foram removidas uma a uma, secando a área ao redor do esfregaço e adicionando 35 μ l do conjugado. Após incubação a 37°C em câmara úmida por 20 minutos, foram lavadas duas vezes em PBS fresco e, cuidadosamente, por três vezes em água corrente sendo, por fim, montadas com meio de montagem e lamínula. A leitura das lâminas foi feita em microscópio de fluorescência em aumento de 40x; as células positivas para CMV deveriam mostrar

coloração fluorescente homogênea verde-amarelada do núcleo polilobulado do neutrófilo. Foram contadas as células positivas em todo o esfregaço e repetida a contagem na duplicata. O resultado positivo deveria ter, no mínimo, duas células fluorescentes por duplicata; o resultado negativo não deveria ter nenhuma célula fluorescente por duplicata.

3.4 Imunofenotipagem de leucócitos de sangue periférico

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram feitos segundo o protocolo proposto pelo fabricante (Becton Dickinson-EUA) e com pequenas modificações conforme descrito a seguir: em tubos de poliestireno 12x75 mm foram adicionados 10 μ l do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse marcado com fluorocromo (TAB. 3). Combinações específicas de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson-EUA), marcados com fluorocromos distintos foram utilizadas para a análise simultânea de marcadores de superfície celular necessários para a caracterização de subpopulações celulares de interesse (TAB. 4). Para cada combinação de anticorpos monoclonais foram adicionadas alíquotas de 100 μ l de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente (18 - 22°C) e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, procedeu-se a lise dos eritrócitos, utilizando-se 2ml de solução de lise comercial (FACS™ Lysing Solution - Becton Dickinson-EUA) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (1300rpm, 7 minutos a 18 - 22°C). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 4ml de isoton (Hemoton- Hemogram®-Brasil) empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Esta etapa foi executada duas vezes consecutivas. Em seguida foram adicionados 250 μ l de isoton em cada tubo. Os parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson, EUA). O programa CELLQuest™- (Becton Dickinson, EUA) foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados empregando-se diferentes estratégias.

TABELA 3

Anticorpos monoclonais utilizados para realização da imunofenotipagem

ANTICORPOS	FENÓTIPO ALVO
Anti-CD3	Linfócitos T
Anti-CD4	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD19	Linfócitos B
Anti-CD14	Monócitos
Anti-CD38	Linfócitos T ativados
Anti-HLA-DR	Linfócitos T e monócitos ativados
Anti-CD16	Monócitos e células <i>natural killer</i>
Anti-CD56	Células <i>natural killer</i>

TABELA 4

Protocolo de seqüência de tubos utilizados para realização de imunofenotipagem

TUBOS	FITC	PE	TC
1	Controle	Controle	Controle
2	CD4	CD8	CD3
3	CD4	HLA-DR	CD8
4	CD4	CD38	CD8
5	CD3	CD56	CD16
6	CD14	HLADR	CD16
7		CD19	

3.5 Estratégias de análises dos resultados

Os dados obtidos através da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram analisados utilizando-se estratégias diferentes, dependendo do fenótipo celular analisado. Assim, empregando-se os recursos múltiplos do programa CELLQuest™, foram adotadas diferentes estratégias para análise fenotípica.

3.5.1 Análise convencional

A análise convencional constitui na seleção da população celular de interesse baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC). Após a seleção da região de interesse (R1), a frequência de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição puntual de fluorescência, incluindo as modalidades FL1 versus FL2, FL2 versus FL3 ou FL1 versus FL3.

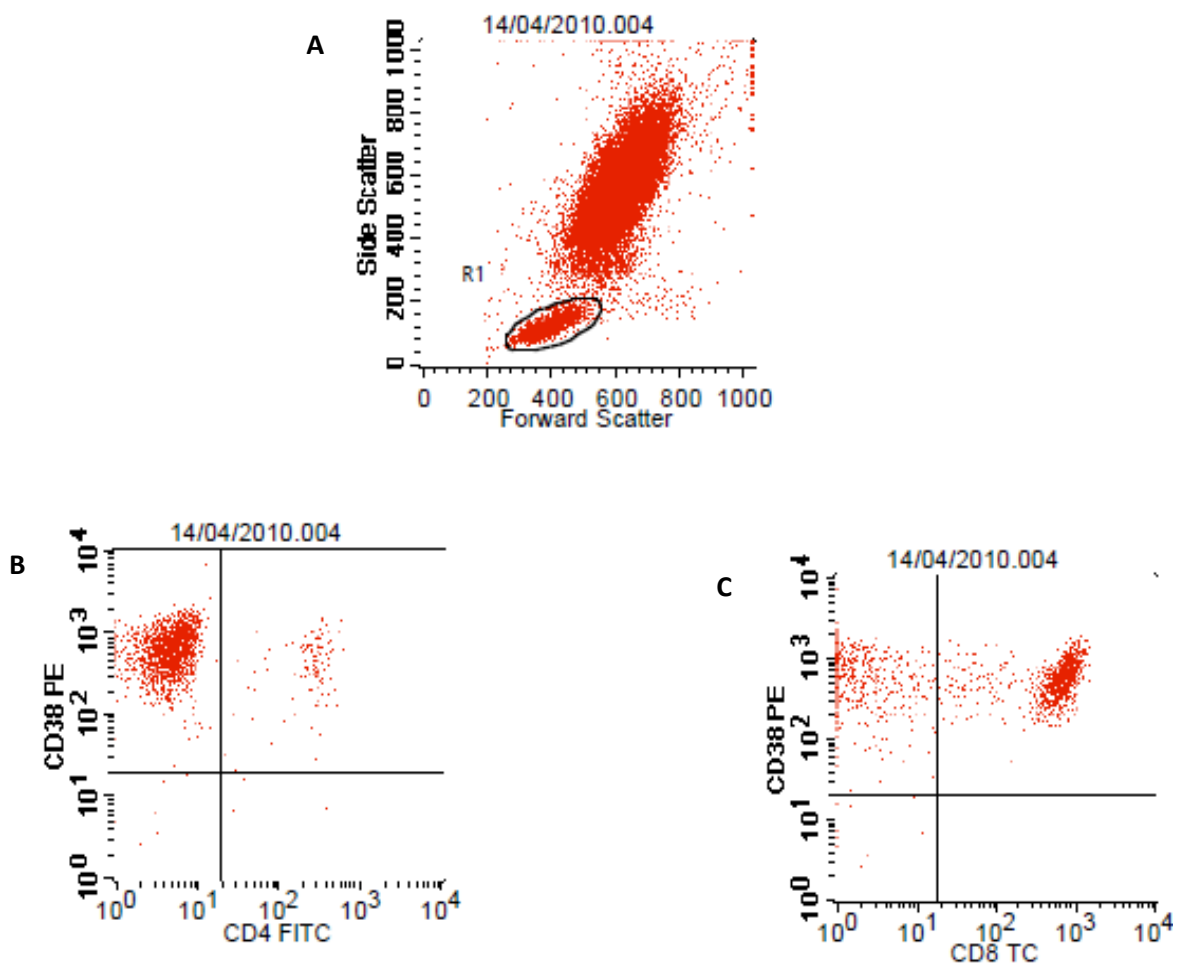


FIGURA 1 - Avaliação do percentual das subpopulações de linfócitos T e o percentual de células CD4+CD38+ e CD8+CD38+ em células do sangue periférico por análise convencional. **A**-Seleção da população celular de interesse em gráfico de tamanho-FSC versus granulidade -SSC. O percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada (R1), pode ser identificado em gráficos bidimensionais de distribuição puntual da fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 2 (FL2) - em **B**; e FL2 versus FL3 - em **C**.

3.5.2 Análise combinada “gated”

A análise da expressão de CD16 e de CD56 em leucócitos do sangue periférico foi realizada segundo Sathler-Avelar, (2003) modificada. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) foram construídos gráficos de *dot plots* de FL1/CD3 onde duas novas regiões R2 e R3 foram construídas, confinando as populações de interesse. O próximo passo consistiu na combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula $G2=R1 \text{ and } R2$, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2. Em seguida um gráfico *dot plots* de FL2/CD56 x FL3/CD16 contendo as células presentes em G2, foi utilizado para quantificar a frequência de células CD16 e CD56 positivas na população de linfócitos CD3 negativos.

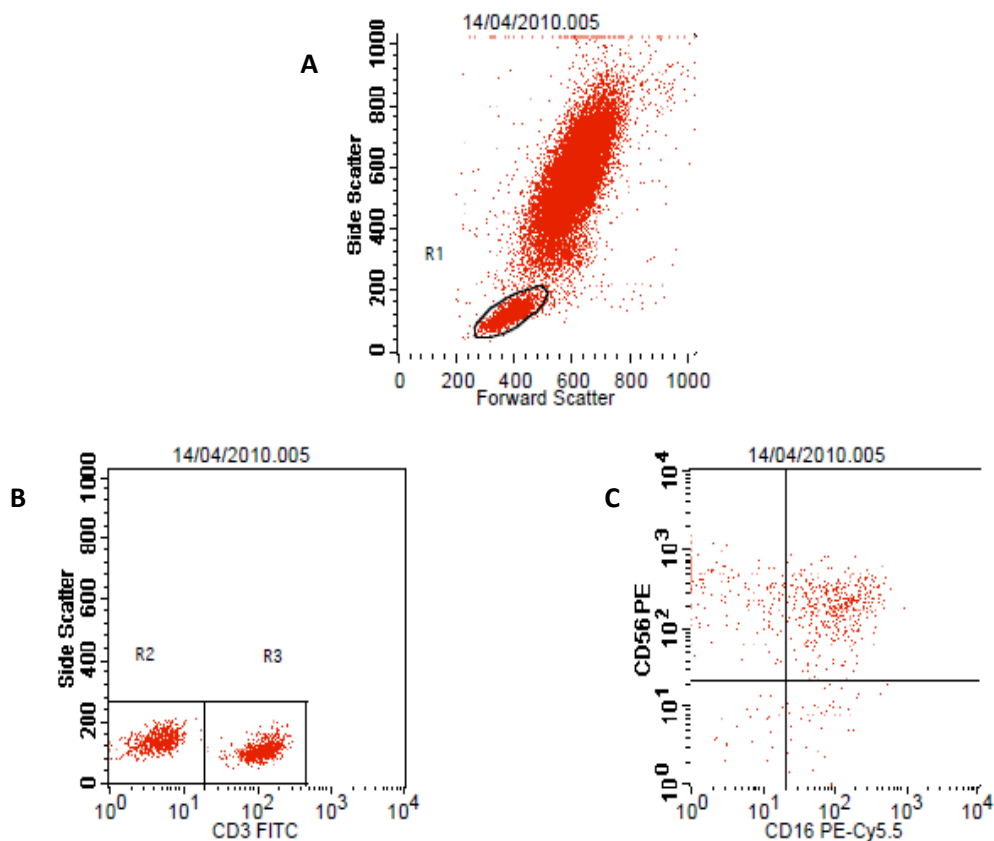


FIGURA 2 - Análise da expressão de CD16 e de CD56 em leucócitos do sangue periférico. **A**-Seleção da região de interesse (R1), através de gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). **B**- Gráfico de *dot plots* de FL1/CD3 onde duas novas regiões R2 e R3 foram construídas, confinando as populações de interesse. **C**- Gráfico *dot plots* de FL2/CD56 x FL3/CD16 construídos pela combinação de R1 e R2, contendo as células presentes em G2, foi utilizado para quantificar a frequência de células CD16 e CD56 positivas para a população de linfócitos CD3 negativos.

3.5.3 Análise semiquantitativa da expressão de FcγR em monócitos

A análise da expressão do receptor Fc gama- Fcγ R3 (CD16) e de HLADR na população de monócitos foi feita através de análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência, segundo protocolo proposto por MARTINS-FILHO, 2000. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos, através de gráficos de distribuição puntual de FL1/CD14 versus granulosidade (SSC) foram construídos histogramas de FL3/CD16 e FL2/DR para a identificação da intensidade média de fluorescência para cada marcador fenotípico analisado na população de monócitos.

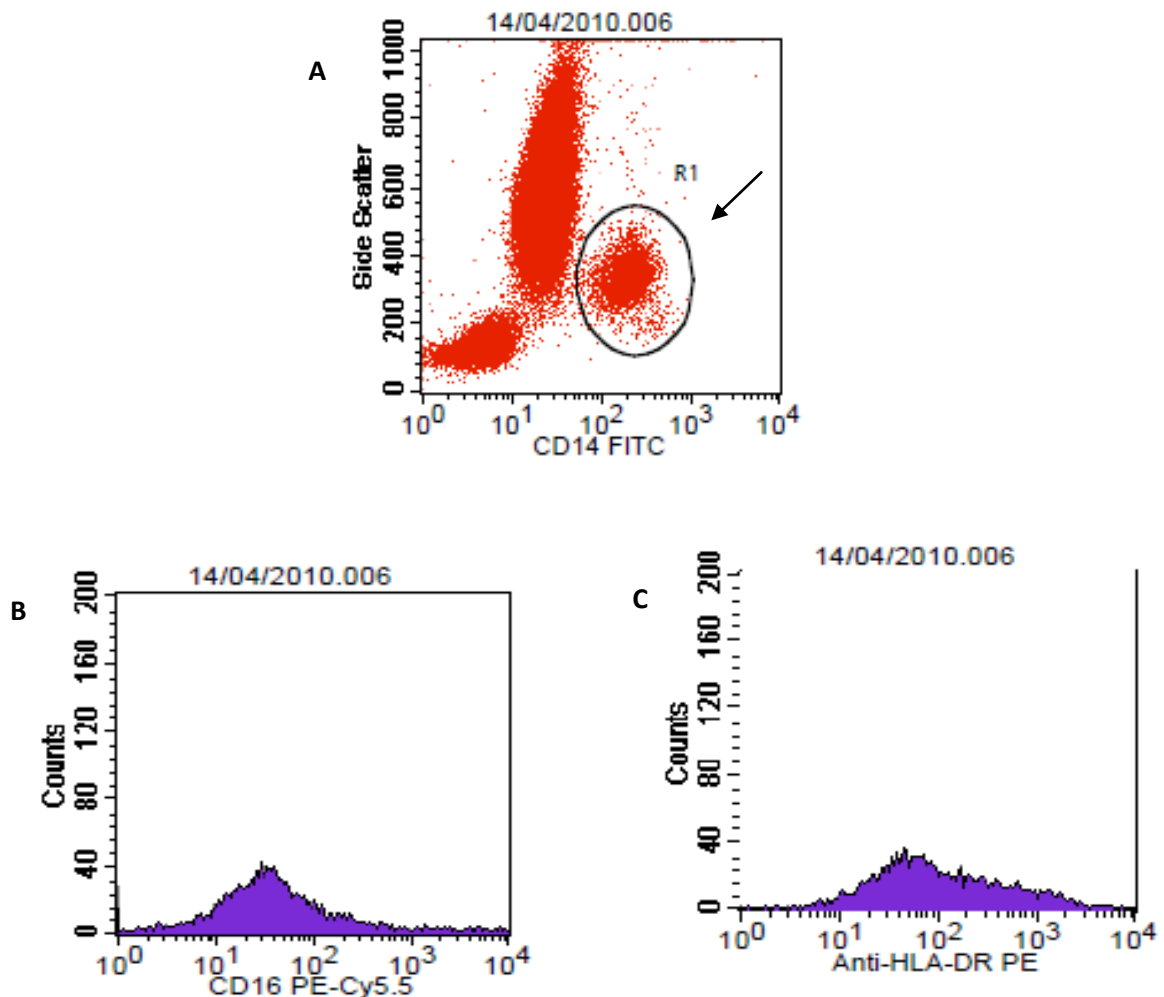


FIGURA 3 - Análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência da expressão de FcγR3 (CD16) e de HLADR na população de monócitos. **A** - Seleção da região de interesse (R1), através de gráfico de distribuição puntual de FL1/CD14 versus granulosidade (SSC). Histogramas de FL3/CD16 (**B**) e FL2/DR (**C**) para a identificação da intensidade média de fluorescência para cada marcador fenotípico analisado na população de monócitos.

3.6 Estudo estatístico

Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Minitab for Windows*. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos. A correlação entre variáveis foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman. Para todas as análises estatísticas foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Evolução dos pacientes durante o estudo

Os quinze pacientes foram seguidos até pelo menos 60 dias após o TCTH. Apenas um paciente não apresentou complicações até a alta hospitalar. Nenhum paciente apresentou infecção primária pelo CMV. Sete pacientes apresentaram reativação do CMV (47%). Seis pacientes (40%) apresentaram DECH aguda. Dois dentre estes apresentaram antigenemia positiva e quatro foram negativos. Quatro pacientes evoluíram para óbito durante a internação (TAB. 5).

TABELA 5
Evolução dos pacientes submetidos ao alo-TCTH

PACIENTE	IDADE	DIAGNÓSTICO DE BASE	Ag D+30	Ag D+60	DECH	OUTRAS INFECÇÕES	ALTA/ÓBITO (D+)
1	53	LMC	neg	neg	não	sim	40
2	31	Aplasia de medula	neg	neg	não	sim	24
3	15	LLA	neg	5 cel	D+47	sim	óbito
4	37	LMC	neg		D+41	sim	óbito
5	42	Aplasia de medula	117 cel	8 cel	D+40	sim	80
6	43	Mieloma múltiplo	3 cel	neg	não	não	16
7	43	LMC	neg	neg	D+11	sim	33
8	43	Mielofibrose	neg	neg	não	sim	26
9	16	LLA Ph 1+	neg	neg	não	sim	30
10	39	LLA	6 cel		D+26	sim	óbito
11	32	Aplasia de Medula	neg		não	sim	31
12	16	LMC	neg	neg	não	sim	66
13	36	Mielodisplasia	10cel		não	sim	óbito
14	42	Aplasia de medula	11 cel	4 cel	não	sim	39
15	49	LMA	1 cel	6 cel	D+17	sim	óbito

De todos os quinze pacientes estudados, treze (86,6%) apresentaram baixa contagem absoluta ($<1000/\text{mm}^3$) e relativa ($\leq 15\%$) de linfócitos totais circulantes no sangue periférico, em ambos os momentos, d+30 e d+60, após o transplante. No d+30, um paciente apresentou contagem absoluta de $1875 \text{ linfócitos}/\text{mm}^3$ e outro contagem relativa de 22%.

As células NK (linfócitos CD3-CD16+CD56+) e monócitos apresentaram-se com contagem normal já no d+ 30 após o transplante (TAB. 6).

O número de células circulantes expressando CD19 (marcador de linfócitos B) foi muito baixo nos dois momentos, aproximando-se de zero. Este marcador foi avaliado apenas nos oito primeiros pacientes estudados e, devido à constatação dos baixíssimos percentuais, sua pesquisa foi abandonada nos demais.

Três pacientes - duas no d+30 e uma no d+30 e no d+60 - não apresentaram quantidade suficiente de linfócitos marcados com os anticorpos monoclonais do protocolo utilizado, para serem analisados adequadamente, sendo estes dados excluídos do estudo. Duas dessas pacientes apresentaram antigenemia positiva e uma foi antigenemia negativa.

4.2 Quantificação de linfócitos T CD4 expressando CD38

Não foram observadas diferenças significativas entre os percentuais de linfócitos T CD4+ expressando CD38, quando comparados os grupos antígenoemia positiva e antígenoemia negativa, nos momentos d+30 e d+60 ($p = 1$ em ambos) (TAB. 6 e 7).

Entretanto, independente de apresentar doença por CMV (antígenoemia \geq duas células/100.000 leucócitos) ou não, todos os pacientes apresentaram altos percentuais de linfócitos T CD4+ CD38+. (TAB. 6 e 7; FIG. 4).

4.3 Quantificação de linfócitos T CD8 expressando CD38

Não foram observadas diferenças significativas entre os percentuais de linfócitos T CD8+ expressando CD38, quando comparados os grupos antígenoemia positiva e antígenoemia negativa, nos momentos d+30 e d+60 ($p = 0,39$ e $0,55$, respectivamente) (TAB. 6 e 7).

Entretanto, independente de apresentar doença por CMV (antígenoemia \geq duas células/100.000 leucócitos) ou não, todos os pacientes apresentaram altos percentuais de linfócitos T CD8+ CD38+. (TAB. 6 e 7; FIG. 4).

4.4 Quantificação de linfócitos T CD4 expressando HLA-DR

Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de células expressando HLA-DR nos linfócitos T CD4+ quando comparados os grupos antígenoemia positiva e antígenoemia negativa, nos momentos d+30 e d+60 ($p = 0,44$ e 1 , respectivamente) (TAB. 6 e 7).

Entretanto, independente de apresentar doença por CMV (antígenoemia \geq duas células/100.000 leucócitos) ou não, todos os pacientes apresentaram altos percentuais de linfócitos T CD4+ HLADR+ (TAB. 6 e 7; FIG. 4).

4.5 Quantificação de linfócitos T CD8 expressando HLA-DR

Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de células expressando HLA-DR nos linfócitos T CD8+ quando comparados os grupos

antigenemia positiva e antigenemia negativa, nos momentos d+30 e d+60 ($p = 0,20$ e 1, respectivamente) (TAB. 6 e 7).

Entretanto, independente de apresentar doença por CMV (antigenemia \geq duas células/100.000 leucócitos) ou não, todos os pacientes apresentaram altos percentuais de linfócitos T CD8+ HLADR+ (TAB. 6 e 7; FIG. 4).

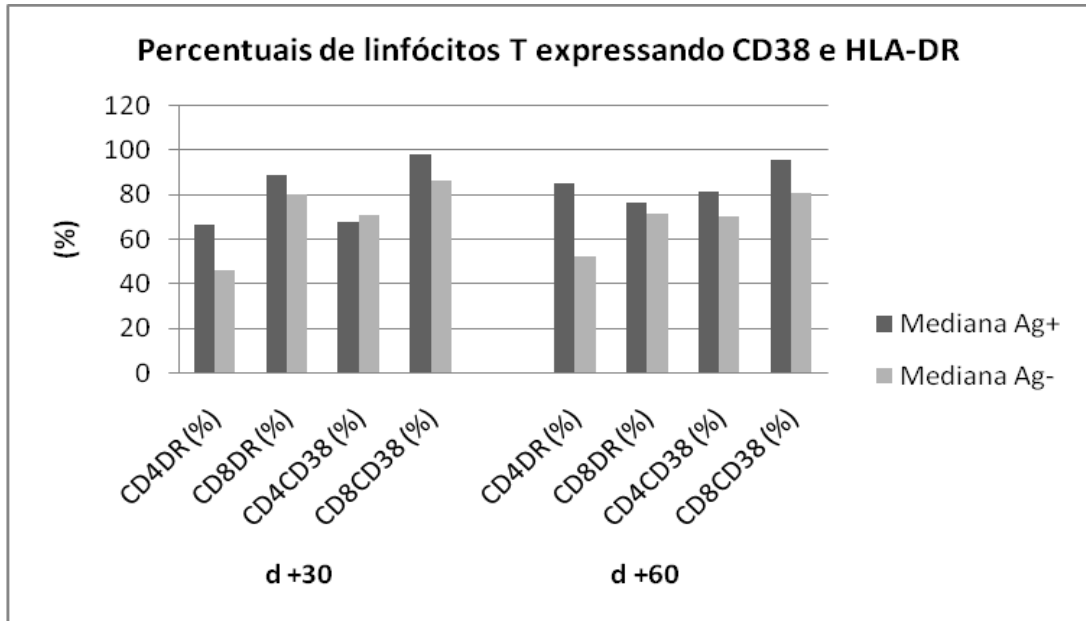


FIGURA 4 – Percentuais de linfócitos T expressando CD38 e HLA-DR

Ag+ = grupo antigenemia positiva; Ag- = grupo antigenemia negativa; n(d+30)=12; n(d+60)=8

4.6 Correlação entre expressão de HLADR e CD38 em linfócitos CD4 e CD8

Considerando a observação do aumento dos percentuais de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando CD38+ e HLA-DR+, estes foram comparados para avaliar possível correlação entre ambos. Observou-se uma correlação positiva no d+ 30 ($r = 0,762$) e significativa ($p = 0,004$), bem como no d+ 60 ($r = 0,881$; $p = 0,004$) entre a expressão de HLA-DR e CD38 nos linfócitos T CD4. Entre os linfócitos T CD8, não houve correlação significativa entre a expressão de HLA-DR e CD38 (FIG. 5).

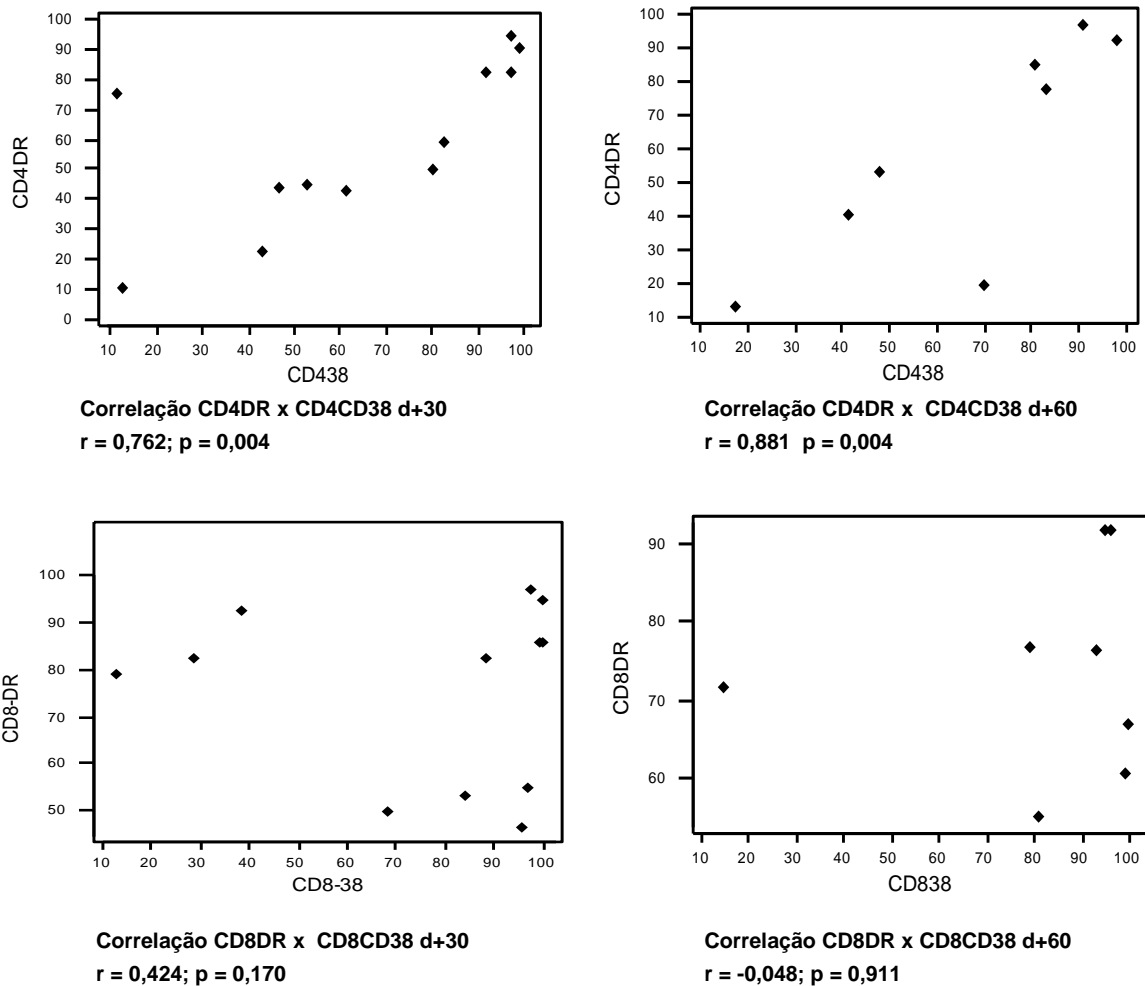


FIGURA 5 - Correlação (r) entre expressão de HLADR e CD38 em linfócitos CD4 e CD8

4.7 Expressão dos demais marcadores em linfócitos e monócitos

Não houve diferenças significativas na expressão dos demais marcadores de linfócitos e monócitos, entre os dois grupos, em ambos os momentos d+ 30 e d+ 60 (TAB. 6 e 7).

TABELA 6

Percentuais de expressão de marcadores em linfócitos e monócitos – d+ 30

D+30	Mediana Ag+	Mediana Ag-	Valor p
CD3 (%)	38,53 (28,04-88,18)	46,82 (18,84-82,34)	1
CD3 CD4 (%)	10,84 (4,68-29,39)	18,36 (4,27-51,16)	0,671
CD3 CD8 (%)	28,57 (5,05-60,73)	18,67 (8,05-58,69)	0,671
CD4DR (%)	66,66 (44,9-90,00)	46,16 (9,63-82,26)	0,444
CD8DR (%)	88,8 (54,71-96,54)	80,25 (46,03-94,29)	0,202
CD4CD38 (%)	67,86 (11,81-99,15)	71,06 (12,68-97,54)	1
CD8CD38 (%)	97,57 (38,40-100,00)	86,43 (13,27-100,00)	0,395
NK TOTAIS (%)	36,7 (13,13-54,01)	31,98(13,83-57,71)	0,798
MON DR+(IMF) ^a	589 (467,79-623,85)	478,3 (15,55-1152,92)	0,798
MON CD16+ (IMF)	282,6(154,02-1260,71)	317,14 (151,92-650,18)	0,932

^aIntensidade média de fluorescência; Ag+ = grupo antigenemia positiva; Ag- = grupo antigenemia negativa; MON = monócitos; NK= células *natural killer*. Teste utilizado: Mann-Whitney, $p < 0,05$, $n=12$

TABELA 7

Percentuais de expressão de marcadores em linfócitos e monócitos – d+ 60

D+60	Mediana Ag+	Mediana Ag-	Valor p
CD3 (%)	43,64 (33,16-49,29)	67,11 (39,42-85,40)	0,136
CD3 CD4 (%)	10,85 (3,2-20,00)	13,04 (3,46-51,07)	0,551
CD3 CD8 (%)	22,25 (9,05-27,86)	29,03 (12,76-69,34)	0,136
CD4DR (%)	84,93 (12,15-84,93)	52,27 (18,72-77,42)	1
CD8DR (%)	76,19 (60,59-91,62)	71,49 (54,94-91,65)	1
CD4CD38 (%)	81,21 (17,47-81,21)	70,31 (41,84-91,25)	1
CD8CD38 (%)	95,15 (93,34-99,23)	80,9 (14,93-99,91)	0,551
NK TOTAIS (%)	42,65 (28,15-43,66)	28,42 (6,35-51,20)	0,765
MON DR+ (IMF) ^a	441,7 (269,64-610,98)	537,2 (356,38-1920,50)	0,371
MON CD16+ (IMF)	383,1 (282,76-675,12)	269,1 (116,78-2129,87)	0,551

^aIntensidade média de fluorescência; Ag+ = grupo antigenemia positiva; Ag- = grupo antigenemia negativa; MON = monócitos; NK= células *natural killer*. Teste utilizado: Mann-Whitney, $p < 0,05$, $n=8$

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nossa proposta foi avaliar marcadores de ativação celular (CD38 e HLA-DR), em linfócitos circulantes de pacientes submetidos ao TCTH alogênico, utilizando a citometria de fluxo e correlacionar os achados com a doença por CMV, cujo diagnóstico foi estabelecido pela antigenemia. Entretanto, ao contrário do encontrado por outros autores em pacientes pós transplante renal e hepático (BELLES-ISLES et al., 1998; BENZ et al., 2002; WANG et al., 2006), não observamos aumento de células T CD38+ e/ou HLADR+ naqueles indivíduos que apresentaram infecção/reativação da infecção pelo CMV quando comparados com aqueles que não apresentaram a doença.

O uso da imunofenotipagem por citometria de fluxo já tem sido utilizada de forma promissora no monitoramento de algumas infecções. Neste contexto, vários autores já demonstraram que a expressão da molécula CD38 em células T CD4+ e T CD8+ é um marcador ativação do sistema imune em adultos (FERRERO et al., 2000; HERTOOGHS et al., 2010; LIU et al., 1997). Em pacientes HIV positivos, uma expressão aumentada de CD38 na população T citotóxica indica uma maior possibilidade de progressão para AIDS, sendo a quantificação de linfócitos T CD8+CD38+ associada à contagem de células T CD4+, bastante utilizada para prever a progressão da doença (LIU et al., 1997). Estes dados reforçaram o nosso interesse em estudar a possibilidade de monitorar fenotipicamente a infecção/reativação por CMV em pacientes submetidos ao TCTH.

Em pacientes transplantados renais, Belles-Isles et al. (1998) encontraram altos percentuais de células T CD8+CD38+ naqueles com doença por CMV - confirmada por um ou mais dos seguintes métodos: antigenemia, cultura positiva para CMV, soroconversão e detecção do vírus em biópsia - quando comparados com aqueles sem doença por CMV. Neste estudo, o valor de corte foi estabelecido com valores obtidos de pacientes sem doença por CMV, os quais apresentaram média de células T CD8+CD38+ de 3,9%, com desvio padrão (DP) de 4,3%, sendo considerado como faixa de referência 0 -21% (média \pm 4 DP). Valores percentuais > 20% corresponderam a 90% de valor preditivo positivo para infecção primária por CMV. Em outro trabalho com transplantados de fígado (BENZ et. al, 2002), os autores mostraram que a freqüência de células T CMV específicas CD38+ naqueles pacientes com soroconversão para IgG ou aumento de IgM anti-CMV, esteve

aumentada de forma significativa, sugerindo ser a análise destas células um bom parâmetro no diagnóstico precoce das complicações hepáticas induzidas pelo vírus. Wang et al. (2006) mostraram em seu estudo que pacientes pós transplante hepático, com infecção ativa por CMV (confirmada por PCR quantitativa ou antigenemia), apresentaram um número de moléculas CD38 expressas nos linfócitos T CD8 significativamente maior ($p < 0,01$), quando comparados com pacientes transplantados sem infecção ativa por CMV e com indivíduos saudáveis, evidenciando assim, que a expressão de CD38 nas células T pode ser muito útil na monitorização da infecção por CMV nos pacientes pós transplante de fígado.

O fato de não termos observado diferenças significativas entre os grupos antigenemia positiva e negativa aponta para as seguintes questões: primeiro, indivíduos pós TCTH, num período muito recente como o estudado, quando sua medula está sendo reconstituída e sob intensa imunossupressão, provavelmente não respondem a infecções virais da mesma maneira que indivíduos pós transplantes de órgãos sólidos, menos imunossuprimidos. Além disto, já foi descrito na literatura que, além das baixas contagens numéricas das células T e B, as funções linfocitárias dessas células permanecem comprometidas por um período maior de tempo (HAKIM et al., 1997; REIS, 2004; STOREK et al., 1993; WILLIAMS; GRESS, 2008). Também é sabido que a contagem de linfócitos T demora meses a um ano até sua completa recuperação, se comparada à das demais populações leucocitárias (GEDDES; STOREK, 2007; REIS, 2004; WILLIAMS; GRESS, 2008). De fato, nossos dados mostraram que, 60 dias após o transplante, o número de linfócitos T era mais baixo que o normal.

Outro ponto relevante a ser considerado é o pequeno número de indivíduos por nós estudado, o que resulta em um pequeno poder estatístico. Devemos considerar também que, a exclusão de dados de três pacientes por não apresentarem quantidade suficiente de linfócitos marcados com os anticorpos monoclonais do protocolo utilizado, pode ter comprometido, parcialmente, a análise final dos dados. Um número maior de pacientes poderia confirmar se efetivamente não existe diferença no número de células T CD8+CD38+ entre os pacientes que apresentaram ou não uma antigenemia positiva para o CMV. Sendo assim, novos estudos com um número maior de pacientes, cujo fenótipo celular pudesse ser comparado com a antigenemia ou com métodos mais sensíveis (PCR *real time*) poderiam ser esclarecedores neste sentido.

Entretanto, um achado intrigante foi o encontro de altos percentuais destas células (>80%), bem como daquelas T CD4+CD38+, independente do resultado da antigenemia, portanto, nos pacientes com ou sem doença por CMV. Os resultados se repetiram quando avaliadas ambas as subpopulações expressando HLADR, sugerindo um estado de ativação linfocitária em todos os pacientes. Faria et al. (2008), estudando indivíduos saudáveis encontraram as seguintes medianas de linfócitos T CD4 e T CD8 HLADR+: 2,6% e 6,0%, respectivamente. Em outro estudo para estabelecer valores de referência para os diferentes fenótipos de linfócitos no sangue periférico (BISSET et al., 2004), foram observadas os seguintes percentuais: CD4+DR+ = 1,7%, CD8+DR+ = 1,0%, CD4+CD38+ =14,85%, e CD8+CD38+ = 2,85%, sendo todos estes valores muito inferiores ao observado por nosso grupo.

Pensou-se num primeiro momento, que o aumento da subpopulação T CD8+CD38+ representaria a reconstituição da nova medula, como acontece no período neonatal, uma vez que este marcador se expressa em células hematopoiéticas precoces, perde-se durante a maturação e reaparece durante a ativação celular. Assim, recém-nascidos expressam altos níveis de CD38 em suas células T, que decaem com a idade (McCLOSKEY et al., 1997; STOREK et al., 1995). Desta forma, nossos achados poderiam apenas estar refletindo a geração *de novo* de linfócitos T, egressos da nova medula e selecionados no timo.

Entretanto, foi demonstrado por alguns destes mesmos autores (STOREK et al., 1995) e outros (GEDDES; STOREK, 2007), que a reconstituição do repertório T após o TCTH é diversa daquela que ocorre nos recém-nascidos. O número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ jovens (*naive*) CD45RA⁺ é maior em neonatos quando comparados aos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea. Storek et al. (1995) mostraram também, que o percentual de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ foi maior em neonatos e menor nos pacientes transplantados, quando comparados a adultos saudáveis, enquanto o percentual daqueles CD8⁺ CD38⁺ foi maior em ambos, embora o número de moléculas CD38⁺ por linfócito T CD8⁺ fosse mais alta nos neonatos que nos pacientes transplantados.

De fato, dados da literatura até o momento, mostram que o repertório de células T logo após o transplante de medula é constituído, em sua maioria, por linfócitos estimulados na periferia e não por células geradas na nova medula. Estes linfócitos seriam constituídos por aqueles originados do enxerto e por alguns remanescentes do receptor, que sofreriam expansão clonal após estimulação

antigênica variada - os próprios antígenos do receptor, vírus, bactérias, fungos - constituindo um novo repertório, porém, de menor diversidade (GEDDES; STOREK, 2007; KRENGER; HOLLÄNDER, 2010; PORTER; JUNE, 2005; WILLIAMS et al., 2007). O aumento dos percentuais de células T CD4 e CD8 expressando HLA- DR e, principalmente, a forte correlação positiva encontrada entre ambos marcadores CD38 e HLADR em células T CD4, reforça a idéia de que estes possam ser, em sua maioria, linfócitos ativadas e não células jovens, imaturas, recém saídas do timo. Trabalhos mostram que linfócitos T ativados expressam maior quantidade da molécula HLA-DR em sua superfície, quando comparados com as células não ativadas (CARUSO et al., 1997; KO et al., 1979). Além disto, um aumento na expressão de HLA-DR nas células T mostrou-se, em alguns estudos, como um marcador de ativação do sistema imune e de maior progressão da infecção por HIV-1 (LIU et al., 1997; ROSENBLATT et al., 2005).

Portanto, nossos achados sugerem que a quantificação de células CD8+ CD38+ por citometria de fluxo não é útil para detecção de infecção/reativação de CMV em pacientes submetidos ao TCTH, posto que todos os pacientes apresentaram expressão aumentada do referido marcador, independente do resultado da antigenemia. Logo, o diagnóstico e monitoramento da infecção por CMV deve ser realizado por testes já estabelecidos e confiáveis – PCR *real time* (LIMAYE et al., 2001; LAZZAROTTO, 2010), no sangue ou plasma, (GAULT et al., 2001; LI et al., 2003), antigenemia (onde os métodos anteriores não estiverem disponíveis), ou ainda por métodos promissores ainda em estudo, como a PCR em tempo real na saliva. CORREIA-SILVA et al., (2010) estudaram a saliva como fonte de monitoramento do CMV em pacientes submetidos ao TCTH, por PCR em tempo real, procurando correlacionar o número de cópias do DNA do CMV na saliva, e no sangue e encontraram uma boa correlação entre os resultados obtidos com os dois tipos de amostras ($r = 0,858$; $p < 0,0001$).

Sendo assim, novos estudos deverão ser conduzidos para investigar estes e outros marcadores de imaturidade, memória e ativação linfocitária em pacientes pós TCTH, procurando possíveis explicações para o fenômeno e sua relação com o desfecho a longo prazo do transplante efetuado, pois é sabido que ativação celular prolongada pode levar à exaustão imune (APPAY et al., 2007; EL-FAR et al., 2008; HERTOGHS et al., 2010; MUELLER; AHMED, 2009).

6 CONCLUSÕES

- 1- Não houve aumento de células T expressando as molécula CD38 e/ou HLADR nos pacientes submetidos ao TCTH alogênico que apresentaram reativação da infecção pelo CMV, quando comparados com aqueles que não apresentaram a doença.
- 2- As células T CD8 e T CD4 expressando CD38 e/ou HLA-DR apresentaram percentuais extremamente elevados quando comparados com os apresentados em outros estudos.
- 3- A reconstituição do sistema imune nos pacientes submetidos ao TCTH, reproduziu os dados da literatura, durante o período estudado.

Este estudo sugere que, em pacientes submetidos ao TCTH, o estudo de subpopulações linfocitárias circulantes ativadas não parece contribuir para a identificação precoce da doença por CMV.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5.ed. São Paulo, Elsevier, 2005, p.544-545.
2. AMOS, T.A.; GORDON, M.Y. Sources of human haematopoietic stem cells for transplantation – a review. **Cell. Transplant.**, London, v.4, n.6, p.547-569,1995.
3. APPAY, V.; ALMEIDA, J.R.; SAUCE, D. et al. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. **Experimental Gerontology**, Paris, v. 42, n.5, p. 432–437, 2007.
4. BALDANTI, F.; LILLERI, D.; GERNA, G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. **J. Clin. Virol.**, Pavia, v.41, n.3, p.237-241, 2008.
5. BELLES-ISLES, M.; HOUDE, I.; LACHANCE, J.G. et al. Monitoring of cytomegalovirus infections by the CD8+CD38+ T-cell subset in kidney transplant recipients. **Transplantation**, Quebec, v.65, n.2, p. 279-282, 1998.
6. BENZ, C.; UTERMÖHLEN, O.; WULF, A.; et al. Activated Virus-Specific T Cells Are Early indicators of Anti-CMV Immune Reactions in Liver Transplant Patients. **Gastroenterology**, Cologne, v.122, n.5, p.1201-1215, 2002.
7. BISSET, L.R.; LUNG, T.L.; KAELIN, M. et al. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. **Eur. J. Haematol.** Zürich, v.72, n.3, p.203-212, 2004.
8. BOECKH, M.; GALLEZ-HAWKINS, G.M.; MYERSON, D. et al. Plasma polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA after allogeneic marrow transplantation: comparison with polymerase chain reaction using peripheral blood leukocytes, pp65 antigenemia, and viral culture. **Transplantation**, Seattle, v.64, n.1, p.108-113, 1997.
9. BOECKH, M.; LEISENRING, W.; RIDDELL, S.R. et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. **Blood**. Seattle, v.101, n.2, p.407-414, 2003.
10. BOECKH, M.; NICHOLS, G.W.; PAPANICOLAOU, G. et al. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Current Status, Known Challenges, and Future Strategies. **Biol. Blood. Marrow. Transplant.**, Seattle, v.9, n.9, p.543-558, 2003.
11. BOFILL, M.; BORTHWICK, N. CD38 in health and disease. **Chem. Immunol.** London; v.75, p.218-234, 2000.

12. BONON, S.H.; MENONI, S.M.; ROSSI, C.L. et al. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. **J. Infect.** São Paulo, v.50, n.2, p.130-137, 2005.
13. BONON, S.H.; ROSSI, C.L.; SOUZA, C.A. et al. Comparison of Serology, antigenemia assay and the polymerase chain reaction for monitoring active cytomegalovirus infections in hematopoietic stem cell transplantation patients. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.48, n.5, p.275-278, 2006.
14. BORISKIN, Y.S.; FULLER, K.; POWLES, R.L. et al. Early detection of cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplant patients by reverse transcription-PCR for CMV spliced late gene UL21.5: a two site evaluation. **J. Clin. Virol.** v.24, n.1-2, p.13-23, 2002.
15. BOSI, A.; BARTOLOZZI, B.; GUIDI, S. Allogenic stem cell transplantation. **Transplant. Proc.**, Florence, v.37, n.6, p. 2667-2669, 2005.
16. BUXBAUM, S.; KRAUS, F.B.; HAHN, A. et al. Flow cytometric analysis of virus-specific T lymphocytes: Practicability of detection of HCMV-specific T lymphocytes in whole blood in patients stem cell transplantation. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.311, n.1-2, p.164-173, 2006.
17. CARUSO, A.; LICENZIATI, S.; CORULLI, M. et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. **Cytometry**, Brescia, v.27, n.1, p.71-76, 1997.
18. CHAO, N.J.; CHEN, B.J. Prophylaxis and treatment of acute graft-versus-host disease. **Semin. Hematol.** Durham, v.43, n.1, p.32-41, 2006.
19. CORREIA-SILVA, J.F.; BRUNA-ROMERO, O.; RESENDE, R.G. et al. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. **Oral Dis.**, v.16, n.2, p.210-216, 2010.
20. COURIEL, D.; CANOSA, J.; ENGLER, H. et al. Early reactivation of cytomegalovirus and high risk of interstitial pneumonitis following T-depleted BMT for adults with hematological malignancies. **Bone. Marrow. Transplant.** Bethesda, v.18, n.2, p.347-353, 1996.
21. CROUGH, T.; KHANNA, R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. **Clin. Microbiol. Rev.**, Brisbane, v.22, n.1, p.76-98, 2009.
22. CUMPRACKER, C.; WADHWA, S. Cytomegalovirus. In: MANDELL, G.; BENNER, T.J.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases.** 6.ed. New York: Elsevier; 2005. p.1786-1801.

23. CUNHA, A.A.; MARIN, L.J.; AQUINO, V.H. et al. Diagnosis of cytomegalovirus infections by qualitative and quantitative PCR in HIV infected patients. **Rev. Inst. Med.Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v.44, n.3, p.127-132, 2002.
24. D'HAUTCOURT, J.L.; ÉRIC, M. Analysis of cellular antigens by flow cytometry. In: MARIE-CHRISTINE, B.; ÉRIC, M. **Immunophenotyping of blood and bone marrow leukocytes**. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, 1997, p.21-27.
25. DAHLLÖF, G.; BAGESUND M.; RINGDEN O. Impact of conditioning regimens on salivary function, caries-associated microorganisms and dental caries in children after bone marrow transplantation. A 4-year longitudinal study. **Bone Marrow Transplant**. Stockholm, v.20, n.6, p.479-483, 1997.
26. DETRICK, B.; HOOKS, J.J.; KEISER, J.; et al. Detections of cytomegalovirus proteins by flow cytometry in the blood of patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. **Exp. Hematol.**, Bethesda, v. 27, n.3, p.569-575, 1999.
27. DOMINIETTO, A.; RAIOLA, A.M.; VAN LINT, M.T., et al. Factors influencing haematological recovery after allogeneic haematopoietic stem cell transplants: graft-versus-host disease, donor type, cytomegalovirus infections and cell dose. **Br. J. Haematol.**, Genova, v.112, n.1, p.219-227, 2001.
28. EI-FAR, M.; HALWANI, R.; SAID, E. et al. T-cell exhaustion in HIV infection. **Curr. HIV/AIDS Rep.**, Montreal, v.5, n.1, p.13-19, 2008.
29. FARIA, A.M.C.; MORAES, S.M.; FREITAS, L.H.F. et al. Variation Rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. **Neuroimmunomodulation**, Belo Horizonte, v.15, n.4-6, p.365-379, 2004.
30. FERRERO, E.; MALAVASI F. The metamorphosis of a molecule: from soluble enzyme to the leucocyte receptor CD38. **J. Leukoc. Biol.**, Ancona, v.65, n.2, p.151-161, 1999.
31. FERRERO, E.; SACCUCCI, F.; MALAVASI, F. The making of a leukocyte receptor: origin, genes and regulation of human CD38 and related molecules. **Chem. Immunol.**, Torino, v.75, p.1-19, 2000.
32. GAULT, E.; MICHEL, Y.; DEHÉE, A. et al. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time PCR. . **J. Clin. Microbiol.**, Paris, v.39, n.2, p.772-775, 2001.
33. GEDDES, M.; STOREK, J. Immune reconstitution following haematopoietic stem-cell transplantation. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, Calgary, v.20, n.2, p.329-348, 2007.

34. GERNA, G.; ZAVATTONI, M.; PERCIVALLE, E. et al. Diagnosis of human cytomegalovirus infections in the immunocompromised host. **Clin. Diagn. Virol.**, Amsterdam, v.5, n.2-3, p.181-186, 1996.
35. HAKIM, F.T.; CEPEDA, R.; KAIMEI, S. et al. Constraints on CD4 Recovery Postchemotherapy in Adults: Thymic Insufficiency and Apoptotic Decline of Expanded Peripheral CD4 Cells. **Blood**, Bethesda, v.90, n.9, p.3789-3798, 1997.
36. HAYASHI, M.L.; BLANKENSHIP, C.; SHENK, T. Human cytomegalovirus UL69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the G1 phase of the cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.97, n.6, p.2692-2696, 2000.
37. HEBART, H.; JAHN, G.; SINZGER, C. et al. CMV Infection in bone marrow and solid organ transplant patients in the era of antiviral prophylaxis. **Herpes**, Tübingen, v.7, n.1, p.13-17, 2000.
38. HERTOOGHS, K.M.; MOERLAND, P.D.; VAN STIJN, A. et al. Molecular profiling of cytomegalovirus induced human CD8+ T cell differentiation. **J. Clin. Invest.** Amsterdam, v.120, n.11, p.4077-4090, 2010.
39. HUUGEN, D.; SCHOUTEN, H.C.; BOS, G.M. Advantages and limitations of (non-) myeloablative allogeneic stem cell transplantation. **Neth. J.Med.** Maastricht, v.60, n.4. p.162-169, 2002.
40. KANO, Y.; SHIOHARA, T. Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. **J. Dermatol. Sci.**, Tokyo, v.22, n.3, p.196-204, 2000.
41. KO, H.S.; FU, S.M.; WINCHESTER R.J.; et al. Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v.150, p.246-255, 1979.
42. KRENGER, W.; HOLLÄNDER, G.A. The role of the thymus in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **Eur. J. Med.**, www.smw.ch – Early Online Publication, 19. April 2010, p.1-11.
43. LACERDA, J.F. Reconstituição imunológica após transplante alogénico de células estaminais. **Acta. Med. Port.**, Lisboa, v.17, n.5, p.471-480, 2004.
44. LACEY, S.F.; DIAMOND, D.J.; ZAIA, J.A. Assessment of cellular immunity to human cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, Duarte, v.10, n.7, p.433-447, 2004.
45. LANZKRON, S.M.; COLLECTOR, M.I.; SHARKS, S.J. Homing of long-term and engrafting cells *in vivo*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Baltimore, v.872, p.48-54, 1999.

46. LAZZAROTTO, T. The Best Practices for Screening, Monitoring and Diagonosis of Cytomegalovirus Diseases, Part I. **Clin. Microbiol. Newsletter**, Bologna, v.32, n.1, p. 1- 6, 2010.
47. LENKEI, R.; ANDERSSON, B. High Correlations of Anti-CMV Titers with Lymphocyte Activation Status and CD57 Antibody-Binding Capacity as Estimated with Three-Color, Quantitative Flow Cytometry in Blood Donors. **Clin. Immunol. Immunopathol.** Stockholm, v.77, n.2, p.131-138, 1995.
48. LI, H.; DUMMER, J.S.; ESTES, W.R. et al. Measurement of Human Cytomegalovirus Loads by Quantitative Real-Time PCR for Monitoring Clinical Intervention in Transplant Recipients. **J. Clin. Microbiol.**, Nashville, v.41, n.1, p.187-191, 2003.
49. LILLERI, D.; FORNARA, C.; CHIESA, A. et al. Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. **Haematologica**, v.93, n.2, p.248-256, 2008.
50. LIMAYE, A.P.; HUANG, M.L.; LEISENRING, W. et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients. **J. Infect. Dis.**, Seattle, v.183, n.3, p.377-382, 2001.
51. LIU, Z.; CUMBERLAND, W.G.; HUTLIN, L.E. et al. Elevated CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter for AIDS Cohort Study than CD4 cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, Los Angeles, v.16, n.2, p.83-92, 1997.
52. LUM, L.G. The Kinetics of Immune Reconstitution After Human Marrow Transplantation. **Blood**, Milwaukee, v.69, n.2, p.369-380, 1987.
53. MARTÍNEZ, C.; URBANO-ISPIZUA, A.; ROZMAN, C., et al. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: comparison of recipients of positive CD34+ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts. **Exp. Hematol.**, Barcelona, v.27, n.3, p.561-568, 1999.
54. MARTINS-FILHO, O.A. Course on flow cytometry In: **XXV Meeting of the Brazilian Society of Immunology**; Florianópolis, SC, Brasil, 2000, p.11-12.
55. MCCLOSKEY, T.W.; CAVALIERE, T.; BAKSHI, S. et al. Immunophenotyping of T lymphocytes by three-color flow cytometry in healthy newborns, children, and adults. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, Manhasset, New York, v.84, n.1, p.46-55, 1997.

56. MEYERS, J.D. Infection in Bone Marrow Transplant Recipients. **Am. J. Med.**, Seattle, v.81, n.1A, p.27-38, 1986.
57. MOTTA, V.N.; MARTINS, S.L. Impairment of cytomegalovirus-specific cellular immune response as a risk factor for cytomegalovirus disease in transplant recipients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.41, n.1, p.5-11, 2008.
58. MUELLER, S.N.; AHMED, R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, New York, v.106, n.21, p.8623-8628, 2009.
59. NEVES, S.P.F.; CLEMENTE, W.T. Investigação laboratorial do paciente com infecção pelo citomegalovírus. In: ERICHSEN, E.S.; VIANA, L.G.; FARIA, R.M.D. et al. **Medicina Laboratorial para o Clínico**. Belo Horizonte; Coopmed Editora Médica, 2009. p.619-627.
60. NUCCI, M.; MAIOLOINO, A. Infecções em transplante de medula óssea. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.33, p.278-293, 2000.
61. OZDEMIR, E.; ST. JOHN, L.S.; GILLESPIE, G. et al. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8 T cells. **Blood**, Oxford, v.100, n.10, p.3690-3697, 2002.
62. PIIPARINEN, H.; HOCKERSTEDT, K.; GRONHAGEN-RISKA, C. et al. Comparison of plasma polymerase chain reaction and pp65-antigenemia assay in the quantification of cytomegalovirus in liver and kidney transplant patients. **J. Clin. Virol.**, Helsinki, v.22, n.1, p.111-116, 2001.
63. PORTER, D.L.; JUNE, C.H. T-cell reconstitution and expansion after hematopoietic stem cell transplantation: 'T' it up! **Bone Marrow Transplantat.**, Philadelphia, v.35, n.10 p.935-942, 2005.
64. REIS, M.A.L.; VISENTAINER, J.E.L. Reconstituição imunológica após o transplante de medula óssea alogênico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Maringá, v.26, n.3, p.212-217, 2004.
65. ROSENBLATT, H.M.; STANLEY, K.E.; SONG, L.Y. et al. Pediatric AIDS Clinical Trials Group 377 Study Team. Immunological response to highly active antiretroviral therapy in children with clinically stable HIV-1 infection. **J. Infect. Dis.**, Houston, v.192, n.3, p.445-455, 2005.
66. RUBIN, R.H. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.324, n.15, p.1057-1059, 1991.

67. SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E.M.; REIS, D.D. et al. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v.58, n.6, p.655-663, 2003.
68. SHERMAN, G.G.; SCOTT, L.E.; GALPIN, J.S. et al. CD38 expression on CD8+ T cells as a prognostics marker in vertically HIV-infected pediatric patients. **Pediatr. Res.** Johannesburg, v.51, n.6, p.740-745, 2002.
69. SPARKES, R.S.; SPARKES, M.C.; CRIST, M. et al. MNSs Antigens Graft versus Host Disease Following Bone Marrow Transplantation. **Tissue Antigens**, Los Angeles, v.15, n.2, p.212-215, 1980.
70. STOREK, J.; FERRARA, S.; KU, N. et al. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? **Bone Marrow Transplant.**, Los Angeles, v.12, n.4, p.387-398, 1993.
71. STOREK, J.; WITHERSPOON, R.P.; STORB, R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. **Bone Marrow Transplant.**, Seattle, v.16, n.3, p.413-425, 1995.
72. SUKWIT, S.; CHUENCHITRA, T.; ROJANASANG, P. et al. Distribution of CD38 Molecules on CD3+ and CD8+T- lymphocyte in Adulthood HIV-1-uninfected Thais. **J. Med. Assoc. Thai.**, Nakhon-Nayok, v.88, p.S48-S55, 2005. Suplemento 1.
73. SVILAND, L.; HRMADNIKOVA, I.; SEDLACEK, P. et al. Histological correlation between different centers using the skin explant model to predict graft-versus-host disease following bone marrow transplantation. **Hum. Immunol.** Bregent, v.62, n.11, p.1277-1281, 2001.
74. WANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; et al. The role of the CD95, CD38 and TGF β 1 during active human cytomegalovirus infection in liver transplantation. **Cytokine**, Tianjin, v.35, n.3-4, p.193-199, 2006.
75. WILLIAMS, K.M.; GRESS, R.E. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem-cell transplantation. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.** London, v.21, n.3, p.579-596, 2008.
76. WILLIAMS, K.M.; HAKIM, F.T.; GRESS, R.E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. **Semin Immunol.**, Bethesda, v.19, n.5, p.318-330, 2007.
77. WOO, S.B.; LEE, S.J.; SCHUBERT, M.M. Graft – host disease. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, Boston, v.8, n.2, p.201-216, 1997.

78. YAN, S.S.; FEDORKO, D.P. Recent advances in laboratory diagnosis of human cytomegalovirus infection. **Clin. Applied Immunol. Rev.**, New York, v.2, n.3, p.155-167, 2002.
79. ZIDOVEC, L.S.; VINCE, A.; DAKOVIC, R.O.; et al. Increased numbers of CD38 molecules on bright CD8+ T lymphocytes in infectious mononucleosis caused by Epstein-barr virus infection. **Clin. Exp. Immunol.**, Zagreb, v.133, n.3, p.384-390, 2003.

ANEXO I

Universidade Federal de Minas Gerais Faculdade de Medicina

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa **“QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD8+ CD38+ POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE INFECÇÃO/REATIVAÇÃO DE CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO-HEMATOPOIÉTICAS”**.

A taxa de mortalidade nos pacientes pós TCTH varia de 15-30%, e a doença por citomegalovírus (CMV), é uma das principais causas desta. A doença por CMV ocorre entre 60 e 70% de pacientes transplantados de medula óssea CMV-soropositivo com pico de incidência 100 dias após o transplante. Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar marcadores de ativação celular em linfócitos circulantes, por citometria de fluxo, em pacientes submetidos ao TCTH e estabelecer sua correlação com a doença por CMV, cujo diagnóstico será estabelecido pela antigenemia. Para esse estudo, utilizaremos a mesma amostra de sangue que já é colhida rotineiramente para o exame de antigenemia.

Este estudo não oferecerá riscos adicionais à sua saúde.

Esta pesquisa poderá contribuir para o diagnóstico precoce da doença pelo CMV em situações em que nem a antigenemia, nem a biologia molecular (PCR) estiverem disponíveis, auxiliando assim a instituição precoce do tratamento. Portanto, melhorando a qualidade de vida dos pacientes submetidos ao transplante.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a utilização do meu sangue para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____ Data: _____

NOME DO RESPONSÁVEL

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: _____

N.º _____

Pesquisador: Vânia Abadia Soares Lino.
Orientador: Prof. Suzane Pretti. Figueiredo Neves

Telefone: (31) 3409-9607
Telefone: (31) 3409 9774 / 9607

ANEXO II - Artigo

Utilidade da quantificação de linfócitos CD8+CD38+ por citometria de fluxo para o acompanhamento de infecção/reativação de citomegalovírus após transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas

Vânia Abadia Soares Lino,¹ Silvana Maria Eloi Santos,² Henrique Neves da Silva Bittencourt,³ Maria Luiza Silva,⁴ Tiago Spizziri,⁵ Raquel Bretas,⁶ Suzane Pretti Figueiredo Neves.⁷

¹Médica Patologista Clínica, mestranda em Patologia Médica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

² Professora Titular, Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Professor Adjunto, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁴ Bioquímica, mestre em Patologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁵ Aluno da graduação, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁶ Aluna da graduação, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁷ Professora Adjunta, Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais

INTRODUÇÃO

O transplante de células tronco – hematopoiéticas alogênico (alo-TCTH) é indicado como medida terapêutica para diversas, insuficiências medulares, doenças imunológicas e distúrbios congênitos da hematopoiese.¹ Antes do transplante o paciente é submetido a um regime de condicionamento com altas doses de quimioterapia associada ou não a irradiação corpórea total, preparando-o assim para receber o enxerto. Em pacientes com doenças não malignas, o condicionamento é direcionado à imunossupressão, ao passo que, para portadores de malignidades, associa drogas citotóxicas e imunossupressoras.² Com isto, estes pacientes tornam-se susceptíveis a diversas infecções ou reativação de infecções latentes. Destas, a infecção pelo citomegalovírus (CMV) é a principal causa de morbidade e mortalidade entre as infecções virais pós TCTH.^{3,4}

O CMV é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, que tem a capacidade de ficar latente no organismo humano podendo reativar-se na vigência de imunossupressão.⁵ Aproximadamente 70% dos receptores de TCTH são CMV-soropositivos e/ou receberão transplante de doador CMV-soropositivo.⁶ Em função

desta alta prevalência de soropositividade, a infecção primária durante o transplante é relativamente rara. A reativação, por outro lado, ocorre em até 60-70% dos pacientes soropositivos após o transplante, principalmente no período compreendido entre o segundo e o sétimo mês após o TCTH e, se não tratada precocemente, pode causar graves comprometimentos em diversos órgãos.⁷ O diagnóstico da doença por CMV usualmente é realizado pela identificação do antígeno pp65 do CMV em neutrófilos (exame conhecido como antigenemia), ou pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR *real time*), através da identificação do DNA viral no plasma ou sangue.⁸ No entanto, essas técnicas são mais demoradas, trabalhosas e de custo elevado, principalmente a antigenemia, mais utilizada em nosso meio. Neste contexto, a citometria de fluxo é uma técnica com grandes vantagens: mínima manipulação de uma grande quantidade de células, sendo um método bastante utilizado para definição de populações celulares por imunofenotipagem,⁹ relativamente rápida e mais barata que a PCR ou antigenemia.

Em adultos, a ativação imune correlaciona-se com um aumento na expressão do marcador CD38 em células T CD4+ e CD8+.¹⁰ O CD38 é uma glicoproteína transmembrana tipo II com atividade enzimática expressa em linfócitos, macrófagos, células endoteliais, células dendríticas e outros tipos celulares.¹¹ Em infecções como a causada pelo HIV, uma expressão aumentada de CD38 e HLA-DR na população T citotóxica indica ativação do sistema imune e maior progressão para AIDS.^{10,12}

Em pacientes transplantados renais, a identificação de um aumento na população de linfócitos T CD8+CD38+ mostrou ser de alta sensibilidade (100%) e especificidade (91%) para o diagnóstico de infecção primária pelo CMV. Em todos os casos, um aumento nesta subpopulação foi detectado precocemente, antes ou junto com os primeiros sinais de infecção pelo CMV.¹³ Em outro estudo com pacientes que receberam transplante hepático, a expressão aumentada de CD38 em linfócitos CMV específicos foi um marcador de infecção ativa por CMV ou reativação.¹⁴ Outra molécula que tem sua expressão aumentada em linfócitos T após eventos de ativação é o antígeno do MHC de classe II, HLA-DR, sejam estes eventos induzidos por processos patológicos ou por imunização.^{15,16}

Em pacientes que receberam TCTH não há estudos que avaliaram que as subpopulações linfocitárias CD4 e CD8 expressando CD38 e HLA-DR para o

diagnóstico da infecção ou reativação por CMV. Sendo assim, a proposta deste estudo foi avaliar por citometria de fluxo, marcadores de ativação celular (CD38 e HLA-DR), nos primeiros dois meses após o TCTH alogênico, em linfócitos circulantes, e correlacionar os achados com a infecção/reativação por CMV.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP (parecer número ETIC 543/07). Foram estudados 15 pacientes submetidos ao TCTH no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de novembro de 2007 a maio de 2010. Como critérios de elegibilidade para inclusão no estudo foram selecionados pacientes submetidos ao TCTH alogênico, de ambos os sexos, de qualquer idade, sem distinção do grupo social (Tabela 1). Estes foram divididos em dois grupos (Ag + e Ag -) de acordo com o resultado da antigenemia (positiva ou negativa), sendo que aqueles com antigenemia negativa foram considerados como grupo controle. Ambos os grupos foram estudados em dois momentos: no dia +30 e no dia +60 após o transplante, período no qual mais frequentemente se observou a infecção/reativação do CMV.

Obtenção de amostra

Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer, Greiner, Brasil), em EDTA, para realização da antigenemia. O restante do material não aproveitado (2 ml) foi utilizado na citometria de fluxo.

Antigenemia para CMV

Utilizamos o Kit CMV Brite Turbo (IQ Products, the Netherlands). A técnica foi realizada conforme instruções do fabricante, com as seguintes etapas: preparo da suspensão de leucócitos; contagem das células em um contador hematológico (Sysmex-Roche); preparo dos citoesfregaços; fixação, permeabilização e coloração fluorescente das lâminas. A leitura destas foi feita em microscópio de fluorescência

(40x); Foram contadas as células positivas mostrando coloração fluorescente homogênea verde-amarelada do núcleo do neutrófilo. Os exames foram feitos em duplicata. O resultado positivo deveria ter, no mínimo, duas células fluorescentes por duplicata; o resultado negativo não deveria ter nenhuma célula fluorescente por duplicata.

Imunofenotipagem de leucócitos de sangue periférico

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram feitos segundo o protocolo proposto pelo fabricante dos anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, EUA), com pequenas modificações: as amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, com o anticorpo monoclonal específico marcado com fluorocromo (Tabela 2). Combinações específicas de anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos distintos foram utilizadas para a análise simultânea de marcadores de superfície celular necessários para a caracterização das populações celulares de interesse (tabela 3). Após incubação, procedeu-se à lise dos eritrócitos, com solução comercial (FACS™ Lysing Solution - Becton Dickinson); o sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com isoton (Hemoton-Hemogram-Brasil). Em seguida adicionava-se 250µl de isoton em cada tubo. Utilizamos o citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson, EUA) eo programa CELLQuest™- (Becton Dickinson, EUA) para a aquisição e análise dos resultados, sendo adquiridos 50.000 eventos/tubo.

Estratégias de análise dos resultados

Os dados obtidos através da imunofenotipagem foram analisados utilizando-se estratégias diferentes, dependendo do fenótipo celular, empregando-se os recursos múltiplos do programa CELLQuest™: análise convencional, análise combinada “gated” para expressão de CD16 e de CD56 segundo Sathler-Avelar (2003)¹⁷, modificada e análise semiquantitativa da expressão de FcγR3(CD16) em monócitos segundo Martins-Filho (2000).¹⁸

Estudo estatístico

Utilizou-se o programa *Minitab for Windows*. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos. A correlação entre variáveis foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman. Para todas as análises estatísticas o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Características clínicas

Os quinze pacientes foram seguidos até pelo menos 60 dias após o TCTH. Apenas um paciente não apresentou complicações até a alta hospitalar. Nenhum paciente apresentou infecção primária pelo CMV. Sete pacientes apresentaram reativação do CMV (47%). Seis pacientes (40%) apresentaram doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda. Três dentre estes apresentaram antígenemia positiva e três foram negativos. Quatro pacientes evoluíram para óbito durante a internação (Tabela1).

Caracterização geral das populações celulares estudadas

De todos os quinze pacientes estudados, treze (86,6%) apresentaram baixa contagem absoluta ($< 1000/\text{mm}^3$) e relativa ($\leq 15\%$) de linfócitos totais circulantes no d+30 e d+60 após o transplante. As células NK (linfócitos CD3-CD16+CD56+) e monócitos apresentaram-se com contagem normal já no d+30 (tabela 4).

O número de células B foi muito baixo nos dois momentos, aproximando-se de zero.

Três pacientes - duas no d+30 e uma no d+30 e no d+60 - não apresentaram quantidade suficiente de linfócitos marcados com os anticorpos monoclonais do protocolo utilizado, para serem analisados adequadamente, sendo estes dados excluídos do estudo. Duas dessas pacientes apresentaram antígenemia positiva e uma apresentou antígenemia negativa.

Expressão de CD38 e HLA-DR em linfócitos T CD4 e CD8

Não foram observadas diferenças significativas no percentual de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando CD38 e HLA-DR quando comparados os grupos antígenemia positiva (Ag+) e antígenemia negativa (Ag-), nos momentos d+30 e d+60 (Tabelas 4 e 5; Figura 1). Ao contrário, independente de apresentar infecção/reativação por CMV (antígenemia ≥ 2 células/100.000 leucócitos) ou não, todos os pacientes apresentaram linfócitos T CD38+ e HLADR+ bastante aumentados (Tabelas 4 e 5; Figura 1).

Expressão dos demais marcadores em linfócitos e monócitos

Não houve diferenças significativas na expressão dos demais marcadores de linfócitos e monócitos, entre os dois grupos, em ambos os momentos d+30 e d+60 (Tabelas 4 e 5).

Correlação entre HLA-DR e CD38 em linfócitos CD4 e CD8

Observamos uma correlação positiva no d+30 ($r = 0,762$; $p < 0,004$) e também no d+60 ($r = 0,881$; $p < 0,004$) entre a expressão de HLA-DR e CD38 nos linfócitos T CD4. Entre os linfócitos T CD8, não houve correlação significativa.

DISCUSSÃO

Nossa proposta foi avaliar marcadores de ativação celular (CD38 e HLA-DR), em linfócitos circulantes de pacientes submetidos ao TCTH alogênico utilizando a citometria de fluxo e correlacionar os achados com a infecção/reativação por CMV, cujo diagnóstico foi estabelecido pela antígenemia. Entretanto, ao contrário do descrito em pacientes pós transplante renal e hepático,^{13,14} não observamos aumento de células T CD38+ e/ou HLADR+ naqueles indivíduos que apresentaram reativação/infecção pelo CMV quando comparados com aqueles que não apresentaram.

Belles-Isles *et al* (1998)¹³ encontraram altos percentuais de células CD8+CD38+ em pacientes transplantados renais com antígenemia positiva quando comparados com

aqueles com antigenemia negativa. Neste estudo, valores percentuais > 20% corresponderam a 90% de valor preditivo positivo para infecção primária por CMV. Em outro estudo em pacientes transplantados de fígado,¹⁴ os autores mostraram que a frequência de células T CMV específicas CD38+ naqueles pacientes com soroconversão para IgG ou aumento de IgM anti-CMV, esteve aumentada de forma significativa, sugerindo ser a análise destas células um bom parâmetro no diagnóstico precoce das complicações hepáticas induzidas pelo vírus. O fato de não termos observado diferenças significativas entre os grupos antigenemia positiva e negativa aponta para as seguintes questões: primeiro, indivíduos pós TCTH, num período precoce como o estudado, quando sua imunidade está sendo reconstituída (ainda sob intensa imunossupressão), provavelmente não respondam a infecções virais da mesma maneira que um indivíduo após transplantes de órgãos sólidos, situação onde a imunossupressão é menos intensa. Além disto, é sabido que, no TCTH alogênico, a contagem de linfócitos T demora meses até um ano até sua completa recuperação, se comparadas às demais populações leucocitárias,^{19,20} o que também foi verificado em nossa casuística onde, 60 dias após o transplante, o número de linfócitos T era mais baixo que o normal. Outro ponto relevante a ser considerado é o pequeno número de indivíduos por nós estudado, o que resulta em um pequeno poder estatístico. Um número maior de pacientes poderia confirmar se efetivamente não existe diferença no número de células T CD8+CD38+ entre os pacientes que apresentaram ou não uma antigenemia positiva para o CMV.

Um fato que chamou atenção foi que, embora não existam diferenças entre os grupos no quesito subpopulação T CD8+CD38+, independente do resultado da antigenemia, (portanto, nos pacientes com ou sem doença por CMV), verificamos percentuais extremamente aumentados destas células (> 80%), bem como nos linfócitos T CD4+CD38+ (> 67%). Os resultados se repetiram quando avaliadas ambas subpopulações expressando HLADR (T CD8+ DR+ > 71% e T CD4+ DR+ > 46%), sugerindo um estado de ativação linfocitária em todos os pacientes após o TCTH alogênico. Faria et al (2008)²¹, estudando indivíduos saudáveis encontraram as seguintes medianas de linfócitos T CD4 e T CD8 HLADR+ : 2,6% e 6,0% respectivamente. Em outro estudo para estabelecer valores de referência para os diferentes fenótipos de linfócitos no sangue periférico,²² foram observadas as seguintes percentuais: TCD4+DR+ = 1,7%, CD8+DR+ = 1%, CD4+CD38+ = 14,85%,

e CD8+CD38+ = 2,85%, sendo todos estes valores muito inferiores ao observado por nosso grupo.

Imaginou-se, num primeiro momento, que o aumento na subpopulação T CD8+CD38+ representaria a reconstituição do sistema imune, como acontece no período neonatal, uma vez que este marcador se expressa em células hematopoiéticas precoces, perde-se durante a maturação e reaparece durante a ativação celular. Assim, recém-nascidos expressam altos níveis de CD38 em suas células T, que decaem com a idade.^{23,11} Desta forma, nossos achados poderiam apenas estar refletindo a geração *de novo* de linfócitos T, egressos do enxerto transplantado e selecionados no timo. Entretanto, seria necessária a marcação das células com outros anticorpos monoclonais característicos deste período, o que não foi realizado neste estudo. Por outro lado, Storek et al (1995)²³ mostraram, que após o TCTH alogênico, a reconstituição do repertório T é diversa daquela que ocorre nos recém-nascidos. Dados da literatura, até o momento, mostram que o repertório T logo após o transplante de medula é constituído, basicamente em sua maioria, por linfócitos T estimulados na periferia e não linfócitos provenientes do enxerto. Estes linfócitos periféricos sofreriam expansão clonal após estimulação antigênica variada - os próprios antígenos do receptor, vírus, bactérias, fungos - desta forma constituindo o novo repertório do receptor porém, com menor diversidade.^{20,24,25} Também o aumento dos percentuais de células T CD4 e CD8 HLA DR+ e, principalmente, a forte correlação positiva encontrada entre ambos marcadores CD38 e HLADR em células T CD4, reforça a idéia de que estas possam ser, em sua maioria, linfócitos ativados e não células jovens, imaturas, recém saídas do timo.

Portanto, nossos achados sugerem que a quantificação de células T CD8+ CD38+ por citometria de fluxo não é útil na detecção de infecção/reativação de citomegalovírus em pacientes submetidos ao TCTH alogênico, posto que todos os pacientes apresentaram altos percentuais destas células, independente do resultado da antigenemia. Logo, o diagnóstico e monitoramento da infecção por CMV deve ser realizado por testes já estabelecidos e confiáveis – PCR *real time*,^{26,27} e antigenemia (onde os métodos moleculares não estiverem disponíveis) no sangue ou plasma, ou por métodos promissores ainda em estudo, como a PCR *real time* na saliva.²⁸ Por outro lado, novos estudos deverão ser conduzidos para investigar estes e outros marcadores de imaturidade, memória e ativação linfocitária e sua relação com o

desfecho a longo prazo do transplante pois é sabido que ativação celular prolongada em outras situações clínicas, pode levar à exaustão imune.^{29,30}

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Woo SB, Lee SJ and Schubert MM. Graft – host disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8(2):201-216.
2. Dahllöf G, Bagesund M and Ringden O. Impact of conditioning regimens on salivary function, caries-associated microorganisms and dental caries in children after bone marrow transplantation. A 4-year longitudinal study. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20(6):479-483.
3. Detrick B, Hooks JJ, Keiser J and Tabbara I. Detections of cytomegalovirus proteins by flow cytometry in the blood of patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 1999; 27(3):569-575.
4. Bonon SHA , Rossi CL, Souza CA, Vigorito AC and Costa SCB. Comparison of Serology, antigenemia assay and the polymerase chain reaction for monitoring active cytomegalovirus infections in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2006; 48(5):275-278.
5. Gerna G, Zavattoni M, Percivalle E, Zella D, Torsellini M and Revello MG. Diagnosis of human cytomegalovirus infections in the immunocompromised host. *Clinical and Diagnostic Virology* 1996; 5(2-3):181-186.
6. Hebart H, Jahn G, Sinzger C, Kanz L and Einsele H. CMV Infection in bone marrow and solid organ transplant patients in the era of antiviral prophylaxis. *Herpes* 2000; 7(1):13-17.

7. Boeckh M, Nichols GW, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR and Zaia J. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Current Status, Known Challenges, and Future Strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9(9):543-558.
8. Piiparinen H, Hockerstedt K, Gronhagen-Riska C, Lappalainen M, Suni J and Lautenschlager I. Comparison of plasma polymerase chain reaction and pp65-antigenemia assay in the quantification of cytomegalovirus in liver and kidney transplant patients. *J Clinical Virol* 2001; 22(1):111-116.
9. D'hautcourt J-L and Éric M. Analysis of cellular antigens by flow cytometry. In: Marie-Christine B, Éric M. *Immunophenotyping of blood and bone marrow leukocytes*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, 1997; 21-27.
10. Liu Z, Cumberland WG, Hutlin LE, Prince HE, Detels R and Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter for AIDS Cohort Study than CD4 cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*, 1997; 16(2): 83-92.
11. McCloskey TW, Cavaliere T, Bakshi S, Harper R, Fagin J, Kohn N, *et al.* Immunophenotyping of T lymphocytes by three-color flow cytometry in healthy newborns, children, and adults. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84(1):46-55.
12. Rosenblatt HM, Stanley KE, Song LY, Johnson GM, Wiznia AA, Nachman SA, *et al.* Pediatric AIDS Clinical Trials Group 377 Study Team. Immunological response to highly active antiretroviral therapy in children with clinically stable HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005; 192(30):445-455.

13. Belles-Isles M, Houde I, Lachance J-Guy, Noël R, Kingma I and Roy R. Monitoring of cytomegalovirus infections by the CD8+CD38+ T-cell subset in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65(2):279-227.
14. Benz C; Utermöhlen O; Wulf A; Villmow B, Dries V, Tobias Geoser, *et al.* Activates Virus-Specific T Cells Are Early indicators of Anti-CMV Immune Reactions in Liver Transplant Patients. *Gastroenterology* 2002; 22(5): 1201-1215.
15. Ko HS, Fu SH, Winchester RJ, Yu DTY and Kunkel HG: Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. *J Exp Med* 1979; 150:246–255.
16. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, *et al.* Flow Cytometric Analysis of Activation Markers on Stimulated T Cells and Their Correlation With Cell Proliferation. *Cytometry* 1997; 27(1):71-76
17. Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PRZ *et al.* Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 2003; 58(6):655-663.
18. Martins- Filho O.A. Course on flow cytometry In XXV Meeting of the Brazilian Society of Immunology; Florianópolis, SC, Brasil, 2000; 11-12.
19. Reis MAL and Visentainer JEL. Reconstituição imunológica após o transplante de medula óssea alogênico. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2004; 26(3):212-217.
20. Williams KM, Hakim FT and Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol* 2007; 19(5):318-330.

21. Faria AMC, Moraes SM, Freitas LHF, Speziali E, Soares TF, Neves SPF, *et al.* Variation Rhythms of Lymphocyte Subsets during Healthy Aging. *Neuroimmunomodulation* 2004; 15(4-6):365- 379.
22. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E and Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* 2004; 72(3): 203–212.
23. Storek J, Witherspoon RP and Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16(3):413 - 425.
24. Geddes M and Storek J. Immune reconstitution following haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2007; 20(2):329 - 348.
25. Williams KM and Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2008; 21(3): 579 – 596.
26. Limaye A P, Huang M L, Leisenring W, Stensland L, Corey L and Boeckh M. Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2001, 183(3):377-382.
27. Gault E, Michel Y, Dehée A, Belabani C, Nicolas J-C and Garbarg-Chenon A. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):772-775.

28. Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, Miranda LP, Oliveira FE and Costa FO. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. *Oral Diseases* 2010; 16(2):210-216.
29. Appay V, Almeida J R, Sauce D, Autran B and Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Experimental Gerontology* 2007; 42(5):432–437.
30. Mueller SN and Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *PNAS* 2009; 106(21):8623-8628.

Figuras

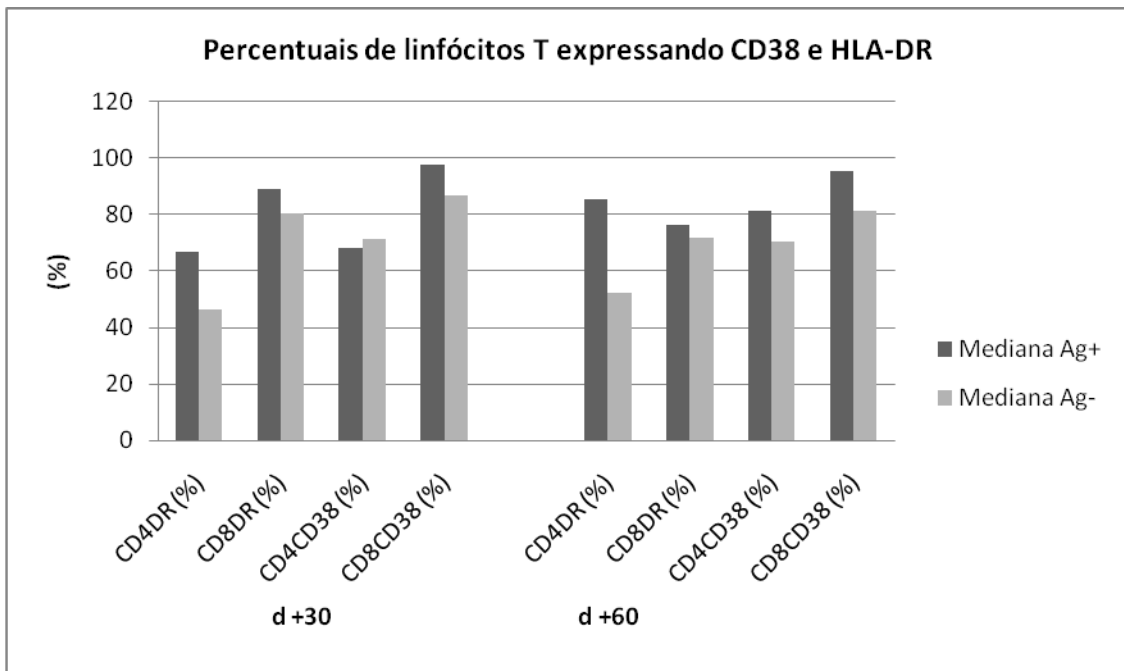


Figura 1 – Percentuais de linfócitos T expressando CD38 e HLA-DR

Ag+ = grupo antigenemia positiva; Ag- = grupo antigenemia negativa; n(d+30)=12; n(d+60)=8

Tabelas

Tabela 1- Características clínicas dos pacientes submetidos ao alo-TCTH (n=15)

Mediana – idade (anos)	39 (15-53)
Diagnóstico de base:	
Aplasia Medular	4
Leucemia linfoblástica aguda	3
Leucemia mielóide crônica	4
Outros ^a	4
Fonte de células tronco	
Medula óssea	8
Sangue periférico	7
HLA – Compatibilidade	
Aparentado	14
Não-aparentado	1
CMV <i>Status</i> sorológico receptor/doador	
Positivo / Positivo	12
Positivo / Negativo	1
Negativo / Negativo	0
Negativo / Positivo	2
Reativação CMV receptor	7
Outras infecções ^b	14
DECH Agudo	6
Óbito na internação	4

^a Leucemia mielóide aguda (1), mielodisplasia (1), mieloma múltiplo (1) e mielofibrose (1)

^b Pneumonia, sinusite, otite e outras sem foco definido.

Tabela 2 - Anticorpos monoclonais utilizados para realização da imunofenotipagem

ANTICORPOS	FENÓTIPO ALVO
Anti-CD3	Linfócitos T
Anti-CD4	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD19	Linfócitos B
Anti-CD14	Monócitos
Anti-CD38	Linfócitos T ativados
Anti-HLA-DR	Linfócitos T ativados
Anti-CD16	Monócitos e células <i>natural killer</i>
Anti-CD56	Células <i>natural killer</i>

Tabela 3 - Protocolo de seqüência de tubos utilizados para realização de imunofenotipagem

TUBOS	FITC	PE	TC
1	Controle	Controle	Controle
2	CD4	CD8	CD3
3	CD4	HLA-DR	CD8
4	CD4	CD38	CD8
5	CD3	CD56	CD16
6	CD14	HLADR	CD16
7		CD19	

Tabela 4 – Percentuais de expressão de marcadores em linfócitos e monócitos – d+ 30

D+30	Mediana Ag+	Mediana Ag-	Valor p
CD3 (%)	38,53 (28,04-88,18)	46,82 (18,84-82,34)	1
CD3 CD4 (%)	10,84 (4,68-29,39)	18,36 (4,27-51,16)	0,671
CD3 CD8 (%)	28,57 (5,05-60,73)	18,67 (8,05-58,69)	0,671
CD4DR (%)	66,66 (44,9-90,00)	46,16 (9,63-82,26)	0,444
CD8DR (%)	88,8 (54,71-96,54)	80,25 (46,03-94,29)	0,202
CD4CD38 (%)	67,86 (11,81-99,15)	71,06 (12,68-97,54)	1
CD8CD38 (%)	97,57 (38,40-100,00)	86,43 (13,27-100,00)	0,395
NK TOTAIS (%)	36,7 (13,13-54,01)	31,98(13,83-57,71)	0,798
MON DR+(IMF) ^a	589 (467,79-623,85)	478,3 (15,55-1152,92)	0,798
MON CD16+ (IMF)	282,6(154,02-1260,71)	317,14 (151,92-650,18)	0,932

^aIntensidade média de fluorescência; Ag+ = grupo antigenemia positiva; Ag- = grupo antigenemia negativa; MON = monócitos; NK= células *natural killer*. Teste utilizado: Mann-Whitney, $p < 0,05$, $n=12$

Tabela 5 – Percentuais de expressão de marcadores em linfócitos e monócitos – d+ 60

D+60	Mediana Ag+	Mediana Ag-	Valor p
CD3 (%)	43,64 (33,16-49,29)	67,11 (39,42-85,40)	0,136
CD3 CD4 (%)	10,85 (3,2-20,00)	13,04 (3,46-51,07)	0,551
CD3 CD8 (%)	22,25 (9,05-27,86)	29,03 (12,76-69,34)	0,136
CD4DR (%)	84,93 (12,15-84,93)	52,27 (18,72-77,42)	1
CD8DR (%)	76,19 (60,59-91,62)	71,49 (54,94-91,65)	1
CD4CD38 (%)	81,21 (17,47-81,21)	70,31 (41,84-91,25)	1
CD8CD38 (%)	95,15 (93,34-99,23)	80,9 (14,93-99,91)	0,551
NK TOTAIS %	42,65 (28,15-43,66)	28,42 (6,35-51,20)	0,765
MON DR+ (IMF) ^a	441,7 (269,64-610,98)	537,2 (356,38-1920,50)	0,371
MON CD16+ (IMF)	383,1 (282,76-675,12)	269,1 (116,78-2129,87)	0,551

^aIntensidade média de fluorescência; Ag+ = grupo antigenemia positiva; Ag- = grupo antigenemia negativa; MON = monócitos; NK= células *natural killer*. Teste utilizado: Mann-Whitney, $p < 0,05$, $n=8$