

RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA APÓS TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS ESTAMINAIS*

JOÃO FORJAZ DE LACERDA

Serviço de Hematologia. Hospital de Santa Maria. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa.

RESUMO

Os doentes submetidos a transplante alogénico de células estaminais têm uma imunossupressão que ultrapassa o primeiro ano pós-transplante. A reconstituição imunológica após um transplante de células estaminais depende de vários factores, tais como a idade do receptor, o grau de parentesco e de compatibilidade HLA entre dador e receptor, o grau de depleção de células T *in vivo* ou *in vitro*, a emergência e eventual tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro. Enquanto que os neutrófilos e as células *natural killer* recuperam nos primeiros dois meses pós-transplante, a reconstituição das imunidades humoral e celular é significativamente mais lenta. É impossível dissociar a emergência de novos linfócitos B da timopoiese, que parece ser determinante para a normal reconstituição da globalidade da imunidade adquirida após o transplante. A análise seriada da recuperação das contagens de células T e seus subtipos, sua função e, mais recentemente, dos círculos de DNA epissómico libertados quando do rearranjo dos genes do receptor de células T, revelam um atraso significativo na reconstituição da função T em doentes adultos, com doença do enxerto contra o hospedeiro crónica extensa e nos primeiros nove meses pós-transplante em doentes submetidos a transplante com depleção de células T. A incidência de infecções oportunistas graves é mais elevada nestes doentes. Assim, com o intuito de reduzir a mortalidade pós-transplante, é importante o desenvolvimento de estratégias para a aceleração da recuperação imunológica. Sabe-se hoje que a imunoterapia celular pós-transplante com leucócitos do dador fortalece o sistema imune incipiente do dador no receptor. Estudos preliminares em modelos animais sugerem também que a interleucina-7 e o factor de crescimento dos queratinócitos estimulam a timopoiese, melhorando assim a reconstituição imunológica pós-transplante.

Palavras chave: *Transplante alogénico de células estaminais, reconstituição imunológica, TREC, Repertório células T*

SUMMARY

IMMUNOLOGIC RECONSTITUTION AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANT

Patients submitted to allogeneic stem cell transplantation have a prolonged immunodeficiency, extending beyond one year post-transplant. The immune reconstitution after an allogeneic stem cell transplant is dependent upon several factors, such as the age of the recipient, the degree of *in vivo* or *in vitro* T-cell depletion, the

*Apresentado em parte na Sessão Educacional da Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia 2003

emergence and eventual treatment of graft versus host disease. While neutrophils and NK cells recover normally within 2 months of transplant, the reconstitution of B- and T-cell immunity is significantly slower. In fact, it is impossible to dissociate the emergence of new B-lymphocytes from thymopoiesis, which appears to be determinant for the normal reconstitution of acquired immunity post-transplant. The serial analysis of T cell counts and its subsets, as well as T-cell function and, more recently, of T-cell receptor excision circles, show a delay in T-cell reconstitution in adult patients, patients with extensive chronic graft versus host disease and in the first 9 months post-transplant in recipients of T-cell depleted grafts. The incidence of opportunistic infections is higher in this population. Therefore, with the aim of reducing post-transplant mortality, the development of new strategies for the acceleration of immune reconstitution is crucial. One possibility is the use of adoptive cellular immunotherapy with donor leukocytes in order to boost the incipient donor's immune system in the receptor. Preliminary studies in animal models also suggest that interleukin-7 and keratinocyte growth factor improve thymopoiesis, thereby stimulating the immune reconstitution post-transplant.

Key-Words: Allogeneic stem cell transplant, Immunologic reconstitution, TREC, T-cell repertoire

INTRODUÇÃO

Com o crescimento do número de doadores inscritos nos registos internacionais e com a introdução de novas técnicas menos tóxicas de transplante alogénico de células estaminais, a elegibilidade para este tipo de procedimento aumentou nos últimos anos. De facto, a introdução de regimes de condicionamento de intensidade reduzida (que não destroem irreversivelmente a medula óssea do doente) permitiu diminuir a mortalidade peri-transplante e tornar elegíveis para esta técnica um conjunto de doentes que não o eram devido a idade mais avançada ou à coexistência de patologias de outros órgãos ou sistemas¹⁻³. No entanto, apesar da redução da toxicidade determinada pela intensidade do regime de condicionamento, a mortalidade associada ao transplante, em particular no contexto de dador não familiar, permanece relativamente elevada⁴. Uma das principais causas de morte após o transplante é a emergência de infecções oportunistas, em parte determinadas pela grave imunossupressão induzida no doente.

A reconstituição imunológica após um transplante de células estaminais depende de vários factores. A idade do receptor parece estar inversamente associada ao grau de imunocompetência pós-transplante⁵. Tal fenómeno pode ter relação com o grau de involução do timo na idade adulta. O grau de parentesco e a compatibilidade HLA entre dador e receptor também podem desempenhar um papel relevante na reconstituição imunológica pós-transplante. Assim, os receptores de enxertos não familiares e/ou não compatíveis podem ter uma imunodeficiência profunda até mais de um ano pós-transplante. Um outro factor influen-

te é o tipo de regime de condicionamento utilizado. Com efeito, com a crescente utilização de regimes de condicionamento sub-mieloablativos, muitos grupos incluíram nos seus protocolos o soro anti-timocitário (ATG) ou o anticorpo monoclonal anti-CD52 (Campath[®]) que, embora destinados a remover as células T do doente e assim permitir uma boa implantação do enxerto, têm uma semi-vida longa e permanecem em circulação até 2 a 4 semanas pós-transplante^{1,3,6}. Deste modo, verifica-se também uma destruição de precursores e células T maduras do enxerto, o que agrava a imunodeficiência pós-transplante. No entanto, um factor benéfico destes regimes de condicionamento de menor intensidade consiste na maior preservação das barreiras epiteliais, diminuindo assim as portas de entrada de microorganismos para a circulação. Nos últimos anos, verificou-se também um interesse crescente na utilização de enxertos manipulados, em particular com depleção de células T, com o intuito de realizar a prevenção da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). A menor transferência de células T do dador para o receptor também poderá influenciar a qualidade da reconstituição imunológica pós-transplante. Finalmente, muitos doentes podem desenvolver DECH aguda ou crónica que, em si mesmo, diminuem as defesas do doente, acrescentando ainda o efeito da terapêutica que é necessário instituir com fármacos imunossuppressores, como é o caso dos corticóides e da ciclosporina A⁷.

Analisaremos em maior detalhe o que se passa com a reconstituição de cada subtipo celular após o transplante e quais os factores que influenciam esta recuperação.

RECONSTITUIÇÃO DE NEUTRÓFILOS E DE CÉLULAS *NATURAL KILLER*

A recuperação da contagem de neutrófilos após um transplante alogénico de células estaminais é rápida, verificando-se cerca 9 a 20 dias após o transplante. Depende da fonte de células estaminais, da utilização de factor de crescimento de granulócitos, que estimula a seu crescimento, e da utilização de metotrexato para prevenção de DECH, que atrasa a sua emergência⁷⁻⁹. Quanto à fonte de células estaminais, a recuperação de neutrófilos é mais rápida após um transplante de células estaminais colhidas do sangue periférico, seguida do transplante de medula óssea, verificando-se um maior atraso nos receptores de transplante de células progenitoras de sangue do cordão umbilical^{8,9}. Este intervalo em que se verifica neutropénia profunda é o de maior risco para infecções oportunistas no período imediato pós-transplante. No entanto, ao surgirem neutrófilos do dador, que são invariavelmente o primeiro sinal da tomada de enxerto, aumenta a protecção do doente contra infecções bacterianas e fúngicas precoces.

Do mesmo modo, a recuperação de células *natural killer* (NK) é relativamente rápida após um transplante alogénico de células estaminais e independente da idade e dos graus de parentesco e de compatibilidade HLA entre dador e receptor¹⁰⁻¹². Numa análise prospectiva em doentes pediátricos e adultos submetidos a transplante de dador familiar ou não familiar com depleção de células T, Small et al não encontraram diferenças na reconstituição de células NK entre os vários grupos, tendo-se atingido valores normais no final do primeiro mês pós-transplante¹⁰. Assim, a maior incidência de infecções oportunistas em grupos de maior risco não parece dever-se a um atraso na recuperação de células NK. Considera-se hoje que a pronta recuperação destas células, em particular se existir uma incompatibilidade entre as moléculas *KIR* (*killer immunoglobulin-like receptors*) do dador e do receptor no sentido do enxerto contra o hospedeiro, é importante na prevenção de recaída leucémica após um transplante alogénico familiar 50% compatível^{13,14}. Assim, neste contexto imunológico, a pronta reconstituição funcional de células NK parece ser muito importante. Em doentes submetidos a transplante alogénico de irmão HLA-compatível, o repertório *KIR* encontra-se normalmente reconstituído aos seis meses pós-transplante¹⁵.

RECONSTITUIÇÃO DE CÉLULAS B

A recuperação da função linfocitária é mais tardia do que a dos neutrófilos e das células NK. O número de linfócitos B, determinado pelo marcador CD20 ou pela presença de imunoglobulina de superfície, normaliza ao

segundo mês pós-transplante e é independente do conteúdo de células T do enxerto^{16,17}. Os primeiros linfócitos B a serem detectados após o transplante exprimem HLA-DR, CD19, CD20, CD21 e imunoglobulina de superfície, sendo negativos para CD10^{17,18}. Para além destes marcadores, os linfócitos B circulantes exprimem ainda no primeiro ano pós-transplante CD1c, CD38, CD5 e CD23, que só são positivos num número pequeno de linfócitos B circulantes em adultos normais, mas têm grande expressão nos linfócitos B do sangue do cordão umbilical¹⁸. Assim, após um transplante alogénico de células estaminais, apesar das células B *naïve* (IgD⁺) aparecerem relativamente depressa, a emergência de células de memória (IgD⁻) é mais lenta. Quando se analisa o repertório VH pós-transplante, verifica-se que é limitado até mais de seis meses pós-transplante e que parece recapitular a ontogénese do linfócito B que ocorre durante a vida fetal^{18,19}. A produção de IgG, IgA e IgM encontra-se diminuída nos primeiros seis meses pós-transplante e é frequente existir uma redução na síntese de IgA, IgG2 e IgG4 até mais de um ano após o transplante^{4,16,20}. As IgA das mucosas também se encontram diminuídas nos primeiros seis meses pós-transplante²¹.

A análise funcional dos linfócitos B *in vitro* pode ser realizada através da estimulação não específica por mitogénios ou após estimulação específica por determinados antigénios. Em regra, as respostas proliferativas dos linfócitos B ao *Staphylococcus aureus* Cowan A (mitogénio) estão reconstituídas ao segundo mês pós-transplante, altura em que se verifica a normalização das contagens de periféricas de linfócitos B^{16,22}. Um método tradicional de examinar a imunocompetência B pós-transplante consiste na avaliação da síntese *in vitro* de imunoglobulinas em resposta à estimulação policlonal de células T por mitogénios. No entanto, nestes ensaios, a produção de imunoglobulinas depende também da normal reconstituição imunológica T. Assim, em comparação com os doentes submetidos a transplante convencional de medula óssea, verifica-se uma diminuição da síntese de imunoglobulinas nos receptores de transplante com depleção de células T até ao fim do primeiro ano pós-transplante²². Em ambos os tipos de transplante, encontram-se níveis de IgM no limite inferior do normal até aos quatro a seis meses pós-transplante, enquanto que os níveis de IgG atingem o limite inferior do normal aos sete a nove meses após o transplante nos receptores de transplante convencional, mas só aos doze meses após um transplante com depleção de células T^{18,22}. A análise da produção de imunoglobulinas em respos-

ta à exposição a antígenos específicos proteicos revela um início de resposta aos três meses pós-transplante, sendo a formação de respostas contra antígenos de polissacarídeos mais tardia²³. Este tipo de resposta também depende da reconstituição imunológica T. Assim, os doentes submetidos a transplante com depleção de células T ou com DECH têm um atraso na síntese de imunoglobulinas ou da conversão de IgM em IgG em resposta à estimulação a antígenos²⁴.

Em receptores de transplante de progenitores de sangue do cordão umbilical, apesar de se verificar um atraso na recuperação de neutrófilos pós-transplante e da transferência de linfócitos B e seus precursores ser muito menor do que num transplante de células progenitoras colhidas do sangue periférico ou de medula óssea, parece existir uma reconstituição do número de linfócitos B comparável ao observado nos outros tipos de transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos^{25,26}. No entanto, outros autores sugerem poder existir um atraso inicial na reconstituição imunológica pós-transplante, que parece ser fundamentalmente qualitativo e devido à imaturidade celular²⁷.

Devido a interdependência entre a reconstituição da imunidade humoral da imunidade celular pós-transplante, vários autores estudaram o efeito da emergência de DECH aguda e crónica e do seu tratamento na reconstituição da função linfocitária B. Storek et al verificaram que os doentes com DECH aguda de graus II a IV apresentavam, em relação àqueles com DECH 0 a I, uma diminuição significativa do número de precursores de linfócitos B na medula óssea avaliados ao dia 30 e 80 pós-transplante²⁸. Os mesmos autores demonstraram que os doentes com DECH crónica extensa tinham uma diminuição significativa do número de precursores de linfócitos B na medula óssea ao dia 365 pós-transplante, em comparação com aqueles com DECH crónica limitada. Noutro estudo, verificou-se que a síntese de imunoglobulinas em resposta à estimulação com antígenos proteicos também estava significativamente diminuída em doentes com DECH crónica²⁴. Assim, a DECH e o seu tratamento parecem ser determinantes na recuperação da imunidade humoral após um transplante alogénico de células estaminais.

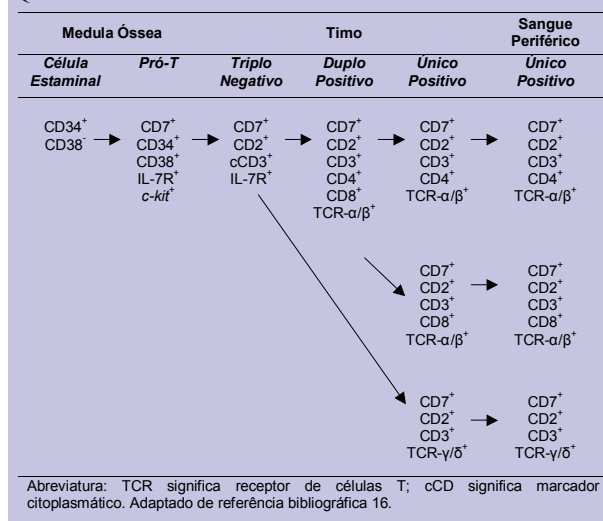
RECONSTITUIÇÃO DE CÉLULAS T

A normal reconstituição da função linfocitária T é fundamental para o desenvolvimento de respostas imunitárias secundárias no período pós-transplante. Para que tal aconteça, a timopoiese desempenha um papel particularmente relevante.

Maturação no Timo

As células hematopoiéticas que se vão diferenciar em linfócitos T entram no timo apresentando como únicos marcadores de superfície mais específicos CD2, CD7 e o receptor para a interleucina (IL)-7 (Quadro 1)²⁹. Nesta fase, são negativos na sua superfície para CD3, CD4 e CD8 (triplo negativo). Já no timo, concomitantemente com a aquisição de CD3, surgem também os receptores de células T (TCR)- α/β ou γ/δ ^{29,30}. Em seguida, os timócitos TCR- α/β^+ adquirem em conjunto CD4 e CD8 e são submetidos aos processos de selecção positiva e negativa. A selecção positiva resulta da interacção do TCR- α/β com as células epiteliais tímicas, resultando na expansão de células específicas para antígenos exógenos^{16,30}. No processo de selecção negativa, dá-se a interacção do TCR- α/β com as células dendríticas provenientes da medula óssea, o que leva à destruição das células auto-reactivas^{31,32}. No final, saem para a circulação células CD3⁺TCR- α/β^+ que são unicamente positivas para CD4 ou para CD8.

Quadro I



O processo de maturação tímica das células CD3⁺TCR α/β^+ após um transplante alogénico de células estaminais é complexo. De facto, o timócito em formação é exposto às células epiteliais tímicas do receptor e a células dendríticas provenientes da medula óssea do dador. Podem também coexistir células apresentadoras de antígeno do receptor, dificultando mais o processo de maturação tímica e pós-tímica. Assim, é fundamental que dador e receptor partilhem antígenos HLA para que se verifique uma adequada diferenciação do linfócito T recém-formado³³⁻³⁵.

No Quadro II encontra-se representado uma experiência em modelo animal que ilustra bem a relevância do timo no desenvolvimento de respostas T secundárias após um

transplante alogénico de células estaminais³⁶. Como estirpe dadora temos ratinhos de estirpe híbrida MHC^{axb}, sendo os receptores ratinhos *nude* (atímicos) imunizados *in vivo* com células tímicas de cada uma das estirpes parentais MHC^a (linha 1) ou MHC^b (linha 2). As células apresentadoras de antígeno (APC) derivam da medula óssea transplantada, ou seja MHC^{axb}. Como se pode verificar nas duas últimas colunas, só se desenvolvem respostas T quando o antígeno é apresentado no contexto da molécula MHC partilhada pelas células epiteliais tímicas e pelas células apresentadoras de antígeno, MHC^a na primeira linha e MHC^b na segunda. Na terceira linha representa-se um transplante totalmente incompatível, em que o dador é homocigótico para MHC^a e o receptor recebe células tímicas homocigóticas para MHC^b. As células apresentadoras de antígeno presentes são as provenientes da medula óssea do dador (MHC^a). Como se pode constatar nas duas últimas colunas, não se dá o desenvolvimento de respostas secundárias T, pois na restrição tímica verifica-se a eliminação de todas as células reactivas contra outros antígenos que não MHC^b. Este grupo de experiências demonstra que para o desenvolvimento de respostas secundárias T pós-transplante é necessária a partilha de pelo menos 1 haplótipo entre as células epiteliais tímicas (do doente) e as células apresentadoras de antígeno (do dador).

Quadro II

Dador	Receptor imunizado <i>in vivo</i>	APC	T contra Ag + MHC ^a APC	T contra Ag + MHC ^b APC
MHC ^{axb}	MHC ^a	MHC ^{axb}	+	-
MHC ^{axb}	MHC ^b	MHC ^{axb}	-	+
MHC ^a	MHC ^b	MHC ^a	-	-

Abreviatura: MHC significa complexo major de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*) e APC refere-se a célula apresentadora de antígeno (*antigen presenting cell*). Ag refere-se a antígeno. Adaptado de referência bibliográfica 36.

A diferenciação de células CD3⁺ TCR- γ/δ ⁺ é menos bem compreendida do que aquela das células TCR- α/β ⁺, não exprimindo à sua superfície da mesma forma as moléculas CD4 ou CD8 (Quadro 1). Os processos de selecção positiva e negativa deste subtipo celular não são bem conhecidos¹⁶.

Várias citocinas, como a IL-2, IL-7 e IL-15 parecem ter um papel relevante na normal diferenciação do linfócito T³⁷. Destas, a IL-7 parece ter um efeito estimulador e anti-apoptótico numa fase ancestral de desenvolvimento do tímócito, em que é triplamente negativo para CD3, CD4 e CD8³⁸.

Reconstituição de Células T Pós-Transplante

Após um transplante alogénico de células estaminais, vários antígenos estimulam respostas T pelas células do dador: (1) antígenos não específicos de tecidos, que podem ser antígenos minor ou major de histocompatibilidade, (2) antígenos específicos de tecido ou com expressão aberrante em células malignas, que podem ser antígenos minor de histocompatibilidade ou proteínas normais expressas na célula neoplásica, (3) antígenos tumorais, como os produtos de certas translocações reconhecidas como importantes na génese da doença, por exemplo a t(9;22), (4) antígenos virais, presentes em células infectadas por determinados vírus, como o citomegalovírus (CMV) ou o vírus de Epstein-Barr (EBV)³⁹. Estas interacções antígeno-célula T são imunodominantes e, conjuntamente com a linfopenia, constituem um estímulo poderoso à proliferação de múltiplos clones de linfócitos T³⁹.

Nos primeiros meses pós-transplante, o repertório imune é dominado por células que provêm da expansão de células T de memória do dador^{40,41}. Estas células pós-tímicas têm um repertório V β restrito e são responsáveis, em parte, pelo *engraftment*, emergência de DECH, efeito do enxerto contra a doença e respostas anti-virais^{42,43}. Assim, têm uma importância fundamental na fase precoce pós-transplante. A fase final da recuperação imunológica envolve a emergência de um novo tipo de células T com origem em precursores pré-tímicos do dador. Estas células, não alorreactivas, vão reconstituir, pelos menos nos doentes jovens com um timo funcionante, a imunocompetência duradoura pós-transplante⁴²⁻⁴⁴. A diferenciação destas células recém-formadas em células efectoras maduras depende do microambiente de citocinas dominante no doente. Assim, se prevalecer a estimulação por IL-4 emergem predominantemente células T *helper* e citotóxicas tipo 2, enquanto que a IL-12 leva à diferenciação de células T *helper* e citotóxicas tipo 1, que podem induzir DECH. No entanto, as células T *helper* tipo 2 podem também estar associadas ao desenvolvimento de DECH crónica³⁹. Assim, factores como a IL-2, IL-7 e IL-12 podem estimular a recuperação da função tímica e a expansão clonal T pós-transplante³⁹. Recentemente, foi descrita uma célula pós-tímica CD4⁺CD25⁺, com capacidade de regular a proliferação de células T e a sua expansão em resposta a antígenos, podendo assim modelar a emergência e gravidade da DECH em modelos animais⁴⁵. No entanto, desconhece-se se estas células têm algum papel no desejado efeito do enxerto contra a doença.

Análise do Imunofenótipo Pós-Transplante

A reconstituição de células T na fase inicial pós-transplante é lenta, verificando-se, em número absoluto, conta-

gens inferiores a $200 \times 10^6/L$ de células $CD4^+$ e $CD8^+$ até aos três meses pós-transplante. Em regra, a recuperação de células $CD8^+$ é mais rápida do que a de células $CD4^+$.^{22,24,46} A emergência de células $CD4^+$ *naïve* ($CD45RA^+$) é particularmente lenta. A capacidade de reconstituir as contagens de células $CD4^+CD45RA^+$ parece depender do grau de compatibilidade entre dador e receptor, da fonte de células estaminais, da depleção de células T do enxerto e do desenvolvimento de DECH e/ou utilização de fármacos imunossupressores para a sua prevenção e/ou tratamento⁴.

A recuperação dos linfócitos T pós-transplante é mais facilmente analisada em receptores de transplante alogénico com depleção de células T, pois nestes a contribuição de células T maduras infundidas na altura do transplante é menor. Vários estudos analisaram de forma sistemática a reconstituição da função imunitária T após um transplante alogénico de células estaminais.

No estudo de Small et al, em doentes submetidos a transplante de medula óssea de dador familiar ou não familiar com depleção de células T após um regime de condicionamento mieloablativo que incluiu ATG, verificou-se um atraso na reconstituição de células $CD3^+$ e $CD8^+$ em adultos submetidos a transplante de dador não familiar quando comparados com crianças submetidas a transplante de dador não familiar e com adultos submetidos a transplante de dador familiar ($P < .01$)¹⁰. Verificou-se também uma diminuição da recuperação destes subtipos celulares em crianças submetidas a transplante de dador não familiar em comparação com aquelas submetidas a transplante de dador familiar, mas só nos primeiros quatro meses pós-transplante ($P < .01$). Após este período, a reconstituição do número de células $CD3^+$ e $CD8^+$ foi idêntica em ambos os grupos, apesar de só as crianças submetidas a transplante de dador não familiar terem recebido ATG. Verificaram-se ainda diferenças importantes na recuperação de células $CD4^+$ não só entre crianças e adultos submetidos a transplante com depleção de células T de dador não familiar ($P < .07$), mas também entre adultos submetidos a transplante de dador familiar ou não familiar ($P < .01$). A maioria dos adultos tiveram contagens de células $CD4^+$ menores do que $100/\mu L$ durante pelo menos seis meses pós-transplante, e contagens inferiores a $200/\mu L$ até aos doze a dezoito meses após o transplante. Os doentes pediátricos apresentaram contagens muito baixas de células $CD4^+$ durante os primeiros quatro meses após o transplante, mais no caso de transplante de dador não familiar, desenvolvendo a maioria níveis superiores a 200 células/ μL aos seis meses e uma normalização entre seis a doze meses pós-transplante. Em relação à análise da recupera-

ção de células $CD4^+$ *naïve* ($CD45RA^+$), os doentes adultos receptores de transplante de dador familiar ou não familiar tiveram uma reconstituição significativamente mais lenta do que as crianças submetidas a transplante de dador não familiar ($P < .01$). Após os primeiros seis meses pós-transplante, não se encontraram neste estudo diferenças significativas na recuperação de células $CD4^+$ e $CD4^+CD45RA^+$ entre crianças submetidas a transplante de dador familiar ou não familiar¹⁰.

Os receptores de transplante de células progenitoras de sangue do cordão umbilical apresentam também uma rápida recuperação de células $CD4^+CD45RA^+$.²⁶ Tal pode ser devido ao facto de muitos destes doentes serem crianças com timo normalmente funcional.

Finalmente, os doentes submetidos a transplante de dador familiar haploidêntico (50% compatível) são aqueles com maior atraso da recuperação das contagens de células $CD4^+CD45RA^+$ pós-transplante. A Figura 1 ilustra a reconstituição de linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD4^+CD45RA^+$ num subgrupo de doentes submetidos a transplante de dador familiar 50% compatível com depleção de células T na nossa Instituição após um regime de condicionamento mieloablativo com ATG¹². Esta técnica obriga a uma depleção *in vitro* de células T e determina uma imunodeficiência significativa no período pós-transplante, com contagens absolutas de células $CD4^+$ e $CD4^+CD45RA^+$ muito baixas. Este fenómeno deve-se em parte à não transferência na altura do transplante de células T precursoras ou maduras, bem como à deficiente reconstituição pós-transplante que, no entanto, é possível pois dador e receptor partilham 1 haplótipo.

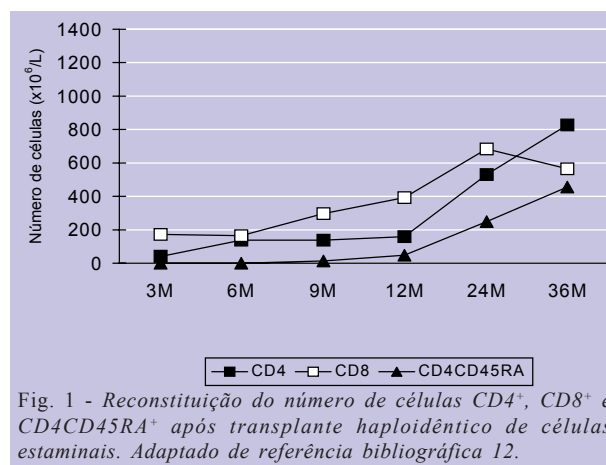


Fig. 1 - Reconstituição do número de células $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD4CD45RA^+$ após transplante haploidêntico de células estaminais. Adaptado de referência bibliográfica 12.

Estudos Funcionais Pós-Transplante

Tão importante como a análise do número absoluto de subpopulações linfocitárias T é a avaliação das respostas proliferativas a mitogénios e antigénios. Nos doentes sub-

metidos a transplante convencional (sem depleção de células T), verifica-se uma diminuição significativa das respostas proliferativas à fitohemaglutinina (PHA) ou ao anticorpo anti-CD3 (estímulos mitogénicos) nos primeiros dois meses pós-transplante²². Ao terceiro mês, a adição exógena de IL-2 pode corrigir este défice⁴⁷. Entre os quatro e os seis meses pós-transplante, as respostas proliferativas normalizam sem necessidade de estimulação *in vitro* com IL-2¹⁶. Nos receptores de transplantes com depleção de células T, a normalização das respostas proliferativas à IL-2 ocorre mais de seis meses após o transplante. No estudo de Small et al, enquanto que os adultos apresentaram respostas proliferativas à PHA inferiores a 25% do normal até aos doze meses pós-transplante, a maioria das crianças normalizaram as suas respostas aos nove meses pós-transplante, indicando uma mais rápida recuperação imunológica¹⁰. Em parte, este diferencial pode estar relacionado com o grau de funcionamento tímico ainda presente em idade pediátrica, permitindo uma normal maturação dos tímócitos, o que já não se verifica com a mesma magnitude nos adultos.

A análise das respostas proliferativas de células T à estimulação com antígenos virais é utilizada para avaliar a recuperação da imunidade celular específica pós-transplante. É raro conseguirem-se detectar respostas específicas aos vírus herpes simplex (HSV), varicella-zoster (VZV) e CMV no primeiro mês pós-transplante. No entanto, a partir do segundo mês começam-se a detectar respostas ao HSV seguidas daquelas ao VZV e ao CMV⁴⁸. Esta aquisição de respostas proliferativas específicas *in vitro* não significa a existência de reconstituição imunológica T específica para esse antígeno. De facto, a análise da frequência de precursores de células T específicas para o EBV ou o CMV pós-transplante revela um atraso maior deste tipo de resposta, que também está dependente do subtipo de transplante realizado, sendo mais lento em receptores de transplantes de dador não familiar e/ou não compatível, com depleção de células T ou com DECH crónica⁴⁹⁻⁵¹.

Técnicas Recentes para Avaliação da Reconstituição Imunológica Pós-Transplante

Recentemente, um novo teste revelou-se bastante fidedigno na avaliação da recuperação de células T *naïve* pós-transplante. Trata-se da determinação dos círculos de DNA epissómico que são gerados quando se dá o rearranjo dos genes que codificam o TCR (*TREC – T cell receptor rearrangement excision circles*), o que só se verifica nas células T emergentes do timo e não naquelas pré-cometidas transferidas no enxerto (Fig. 2)^{52,53}. Lewin et al analisaram por PCR o número de *TRECs* em 158 doentes submetidos a

transplante alogénico de células estaminais após um regime de condicionamento mieloablativo⁵⁴. Cerca de 80% dos doentes tinham recebido um transplante com depleção de células T, em que foi administrado ATG, enquanto que os restantes foram submetidos a transplante convencional de células estaminais. Só estes últimos foram tratados com fármacos imunossupressores para prevenção de DECH. Um total de 113 doentes recebera transplante de dador familiar (HLA-compatível n=100; HLA não compatível n=13), e 45 doentes de dador não familiar. Estes autores verificaram que os doentes com menos de 19 anos tinham um maior número de *TRECs* em relação aos doentes adultos ($P=.02$). Neste estudo foi também realizada a análise comparativa entre receptores de transplante convencional e aqueles com depleção de células T, tendo-se verificado uma diferença significativa entre os dois grupos a favor dos receptores de transplante convencional, mas unicamente nos primeiros nove meses pós-transplante ($P<.01$). Não foi encontrada uma correlação entre os níveis de *TRECs* e o grau de compatibilidade HLA e parentesco entre dador e receptor. Também não observaram uma correlação com o desenvolvimento de DECH aguda. No entanto, um baixo número de *TRECs* está fortemente ligado ao desenvolvimento de DECH crónica extensa, em contraste com o que se verifica em doentes sem DECH crónica ou com DECH crónica limitada ($P<.01$). Finalmente, encontrou-se uma forte correlação entre o baixo número de *TRECs* pós-transplante e o desenvolvimento de infecções oportunistas graves ($P<.01$). Este estudo demonstra que doentes de todas as idades submetidos a transplante convencional ou com depleção de células T têm a capacidade de gerar novos linfócitos T, mesmo aqueles tratados com ATG. Uma baixa produção de *TRECs* associa-se a um aumento da morbidade e mortalidade pós-transplante. Weinberg et al verificaram também uma diminuição significativa no número de *TRECs* em doentes mais idosos e com DECH⁵⁵.

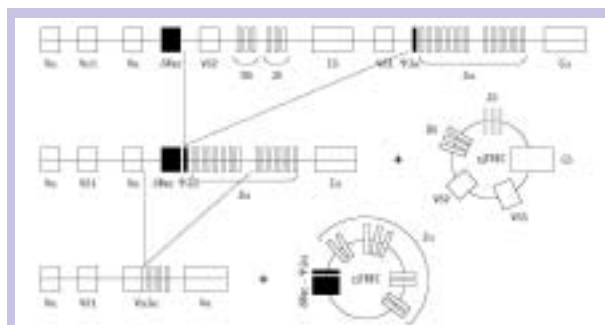


Fig. 2 - Síntese de sjTREC e cjTREC durante o processo de rearranjo do locus TCR- α/δ , que ocorre na maioria das células TCR- α/β + emergentes do timo. Adaptado de referência bibliográfica 52.

O repertório V β do TCR pós-transplante tem sido analisado de forma fina através da tipagem das sequências da região CDR3 (*Complementary-Determining Region 3*)⁵⁶. Verfuert et al analisaram a diversidade do repertório V β por esta técnica em 19 doentes com leucemia mielóide crónica submetidos a transplante com depleção de células T⁴¹. Neste estudo longitudinal, foi encontrada uma irregularidade no repertório nos primeiros seis meses após o transplante, que retomava um padrão próximo do normal aos doze meses após o transplante. No entanto, só cerca de 30% dos doentes apresentavam um padrão normal aos dois a três anos após o transplante. Os doentes com DECH apresentavam um padrão mais irregular⁵⁶. Assim, a reconstituição do repertório T pós-transplante está dependente de vários factores tais como o regime de condicionamento, a depleção de células T do enxerto, a função tímica no doente adulto e a emergência de DECH e seu tratamento imunossupressor⁴¹.

ESTIMULAÇÃO DE RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA PÓS-TRANSPLANTE

Transplante de Células Estaminais Colhidas do Sangue Periférico

Um número considerável de transplantes alogénicos de células estaminais realizam-se actualmente com células estaminais colhidas do sangue periférico do dador após estimulação com factor de crescimento dos granulócitos (G-CSF). Existe uma tendência para o abandono progressivo da técnica tradicional de colheita de medula óssea em bloco cirúrgico. O transplante de células colhidas do sangue periférico, bem como a administração de G-CSF pós-transplante, tem a vantagem de permitir uma recuperação mais rápida de neutrófilos, a que se associa uma diminuição do número de dias de neutropénia, de administração de antibióticos por via intravenosa e de hospitalização. Nos doentes submetidos a transplante haploideítico de células estaminais, a administração de G-CSF no período pós-transplante parece determinar um atraso na reconstituição imunológica, dado que diminui a produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígeno⁵⁷.

Tão importante como a redução dos dias de neutropénia absoluta, parece ser a mais rápida recuperação de células CD4⁺ pós-transplante, observada tanto em receptores de transplantes convencionais como de transplantes com depleção de células T, a que se associa uma diminuição de infecções no primeiro ano pós-transplante. Assim, o transplante de células progenitoras colhidas do sangue periférico parece acelerar a imunidade pós-transplante.

Efeito da Infusão de Leucócitos de Dador

A infusão de leucócitos de dador após um transplante alogénico de células estaminais tem sido utilizada de forma crescente na prevenção e tratamento da recaída da doença

oncológica e de complicações infecciosas, como a doença a citomegalovírus (CMV) e a doença linfoproliferativa com origem nas células B do dador induzida pelo vírus de Epstein-Barr (EBV), bem como para melhorar a reconstituição imunológica pós-transplante⁴⁹⁻⁵¹. Um efeito adverso importante desta técnica é o desenvolvimento de DECH, com excepção dos casos em que se procede à infusão de células T citotóxicas ou clones específicos para o EBV ou para o CMV.

Provavelmente, o que se obtém com a infusão de leucócitos de dador no período pós-transplante é um fortalecimento do sistema imunológico do dador, ainda incipiente no receptor. De facto, Small et al analisaram a evolução da contagem de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ após a infusão de células mononucleadas do sangue periférico de dador em doentes com doenças linfoproliferativas EBV⁺ pós-transplante, e verificaram um aumento significativo no número absoluto destas células após a infusão¹⁰. Assim, com a administração de linfócitos policlonais, o sistema imune passa a ser mais competente e consegue desenvolver respostas imunitárias T secundárias. Deste modo, não estranha o desenvolvimento de DECH, dado que os alo-antígenos não partilhados são também reconhecidos como estranhos. O mesmo se passa com as infusões de leucócitos para tratamento de doença oncológica em recaída. Alguns estudos indicam que a resposta é, provavelmente, mais alorreactiva do que específica para antígenos tumorais⁵⁸. Com a infusão de clones específicos para o CMV, dá-se uma resposta mais direccionada, pois são infundidas as células efectoras, sem risco de DECH, mas também sem fortalecimento geral do sistema imunológico⁵⁰.

Estimulação da Função Tímica Pós-Transplante

Nos últimos anos, tem sido investigado o papel de citocinas na aceleração da reconstituição imunológica pós-transplante. Devido à expressão do receptor para a IL-7 por tímicos imaturos, vários investigadores analisaram o efeito desta citocina na imunidade pós-transplante. Utilizando modelos animais de transplante alogénico de células estaminais, verificou-se que a administração de IL-7 levava a um aumento de células T *naïve* e à expansão de células T periféricas pós-transplante^{59,60}. A IL-7 também aumenta a contagem de células CD4 em primatas⁶¹. Em cultura, e num modelo de xenotransplante em ratinhos, a IL-7 estimulou o aumento do número de *TRECs*⁶². Assim, existem vários estudos pré-clínicos que sugerem um efeito benéfico da IL-7 na estimulação da timopoiese após um transplante alogénico de células estaminais.

O factor de crescimento dos queratinócitos (*keratinocyte growth factor* – *KGF*) foi desenvolvido para diminuir a toxicidade gastrointestinal e pulmonar da quimi-

oterapia e da radioterapia⁶³. Em modelos experimentais de transplante alogénico de células estaminais, verificou-se que facilitava a tomada de enxerto e diminuía a incidência de DECH ao manter a integridade da barreira gastrointestinal com a consequente prevenção da geração de citocinas pró-inflamatórias⁶⁴. Por um mecanismo idêntico, o KGF promove a epiteliação alveolar e estimula a produção de surfactante pulmonar, atenuando a lesão pulmonar mediada imunologicamente. A redução da incidência de DECH não se acompanha de uma diminuição das respostas anti-leucémicas pós-transplante⁶⁵. No entanto, o KGF demonstrou ter em modelos animais um efeito protector do epitélio tímico, melhorando a reconstituição imunológica pós-transplante⁶⁶. De facto, neste grupo de experiências verificou-se um aumento da produção de tímócitos e a normalização da proporção de subpopulações tímicas nos animais tratados. No sangue periférico, demonstrou-se um aumento de células T *naïve*, bem como uma melhoria das respostas a neo-antígenos. Este efeito parece ser mediado pela estimulação da síntese de IL-7 tímica. A preservação da timopoiese e do microambiente tímico verifica-se mesmo com a indução de DECH⁶⁷. Deste modo, o fortalecimento do sistema imunológico pós-transplante pode ser importante não só para a redução das complicações infecciosas, como também para o reconhecimento de células leucémicas residuais e assim reduzir o risco de recaída pós-transplante.

CONCLUSÃO

A análise da reconstituição imunológica pós-transplante é uma área de grande relevância clínica. Num futuro não muito longínquo, poderemos passar à administração selectiva de células e/ou de citocinas que terão como objectivo o fortalecimento do sistema imunológico incipiente do dador no doente, bem como de reacções específicas anti-tumorais. Esta modulação imunológica constitui hoje uma poderosa arma na terapêutica do doente com uma neoplasia passível de ser tratada com um transplante alogénico de células estaminais.

BIBLIOGRAFIA

1. GEORGES GE, MARIS M, SANDMAIER BM et al: Related and unrelated nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for malignant diseases. *Int J Hematol* 2002;76:184-189
2. KROGER N, SAYER HG, SCHWERDTFEGER R et al: Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood* 2002;100:3919-3924
3. CHAKRAVERTY R, PEGGS K, CHOPRA R et al: Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* 2002;99:1071-1078
4. CORNELISSEN JJ: Immune reconstitution after allogeneic transplantation: clinical and experimental findings. *Hematol J* 2002;3:101-105
5. SMALL TN, AVIGAN D, DUPONT B et al: Immune reconstitution

following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997;3:65-75

6. LACERDA JF, MARTINS C, CARMO JA et al: Unrelated stem cell transplantation following a novel reduced intensity conditioning regimen and mycophenolate mophetil plus cyclosporine A as graft versus host disease prophylaxis. *Blood* 2003;102:430b
7. APPELBAUM FR: The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu Rev Med* 2003;54:491-512
8. SCHMITZ N, BARRETT J: Optimizing engraftment—source and dose of stem cells. *Semin Hematol* 2002;39:3-14
9. ELFENBEIN GJ, SACKSTEIN R: Primed marrow for autologous and allogeneic transplantation: a review comparing primed marrow to mobilized blood and steady-state marrow. *Exp Hematol* 2004;32:327-39
10. SMALL TN, PAPAPOULOS EB, BOULAD F: Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood* 1999 Jan 15;93:467-80
11. HANDGRETINGER R, LANG P, SCHUMM M et al: Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:340-358
12. LACERDA JF, MARTINS C, CARMO JA et al: Haploidentical stem cell transplantation with purified CD34 cells after a chemotherapy-alone conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:633-642
13. RUGGERI L, CAPANNI M, CASUCCI M et al: Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999;94:333-339
14. RUGGERI L, CAPANNI M, URBANI E et al: Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100
15. SHILLING HG, MCQUEEN KL, CHENG NW, SHIZURU JA, NEGRIN RS, PARHAM P: Reconstitution of NK cell repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003;101:3730-40
16. PARKMAN R, WEINBERG KI: Immunologic reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation. In: *Hematopoietic cell transplantation*. Ed: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ. Blackwell Science Inc 1996. Pg 704-711
17. AULT KA, ANTIN JH, GINSBURG D, et al: Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *J Exp Med* 1985;161:1483-502
18. SMALL TN, KEEVER CA, WEINER-FEDUS S, HELLER G, O'REILLY RJ, FLOMENBERG N: B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 1990;76:1647-56
19. STOREK J, KING L, FERRARA S, MARCELO D, SAXON A, BRAUN J: Abundance of a restricted fetal B cell repertoire in marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:783-90
20. STOREK J, JOSEPH A, ESPINO G et al: Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001;98:3505-3512
21. CHAUSHU S, CHAUSHU G, GARFUNKEL AA, SLAVIN S, OR R, YEFENOF E: Salivary immunoglobulins in recipients of bone marrow grafts. I. A longitudinal follow-up. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:871-6
22. KEEVER CA, SMALL TN, FLOMENBERG N et al: Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts. *Blood* 1989;73:1340-50
23. AUROUTURIER P, BARRA A, INTRATOR L et al: Long lasting IgG subclass and antibacterial polysaccharide antibody deficiency after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1987;70:779-785
24. FRIEDRICH W, O'REILLY RJ, KOZINER B, GEBHARD DF JR, GOOD RA, EVANS RL: T-lymphocyte reconstitution in recipients of bone marrow transplants with and without GVHD: imbalances of T-cell subpopulations having unique regulatory and cognitive functions. *Blood* 1982;59:696-701
25. NIEHUES T, ROCHA V, FILIPOVICH AH et al: Factors affecting

- lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children — a Eurocord analysis. *Br J Haematol* 2001;114:42-8
26. MORETTA A, MACCARIO R, FAGIOLI F et al: Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol* 2001;29:371-9
27. INOUE H, YASUDA Y, HATTORI K et al: The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34+ stem cell transplantation in children: comparison with bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 2003;77:399-407
28. STOREK J, WELLS D, DAWSON MA, STORER B, MALONEY DG: Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2001;98:489-491
29. HAYNES BF, DENNING SM, LE PT, SINGER KH: Human intrathymic T cell differentiation. *Semin Immunol* 1990;2:67-77
30. HAYNES BF, DENNING SM, SINGER KH, KURTZBERG J: Ontogeny of T-cell precursors: a model for the initial stages of human T-cell development. *Immunol Today* 1989;10:87-91
31. HAYNES BF: Human thymic epithelium and T cell development: current issues and future directions. *Thymus* 1990;16:143-57
32. VON BOEHMER H, AIFANTIS I, GOUNARI F et al: Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev* 2003;191:62-78
33. WEINBERG K, ANNETT G, KASHYAP A, LENARSKY C, FORMAN SJ, PARKMAN R: The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 1995;1:18-23
34. HAKIM FT, GRESS RE: Reconstitution of thymic function after stem cell transplantation in humans. *Curr Opin Hematol* 2002;9:490-496
35. FINK PJ, BEVAN MJ: H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J Exp Med* 1978;148:766-775
36. JANEWAY CA, TRAVERS P: The thymus and the development of T lymphocytes. In: *Immunobiology. The immune system in health and in disease*. Current Biology, Garland, Churchill Livingstone, 1997. pg 6:1-6:32
37. PORTER BO, MALEK TR: Thymic and intestinal intraepithelial T lymphocyte development are each regulated by the gammac-dependent cytokines IL-2, IL-7, and IL-15. *Semin Immunol* 2000;12:465-74
38. KHALED AR, DURUM SK: Death and Baxes: mechanisms of lymphotropic cytokines. *Immunol Rev* 2003;193:48-57
39. BARRETT AJ, REZVANI K, SOLOMON S et al: New developments in allotransplant immunology. *Hematology* 2003;350-71
40. VAVASSORI M, MACCARIO R, MORETTA A et al: Restricted TCR repertoire and long-term persistence of donor-derived antigen-experienced CD4+ T cells in allogeneic bone marrow transplantation recipients. *J Immunol* 1996;157:5739-47
41. VERFUERTH S, PEGGS K, VYAS P, BARNETT L, O'REILLY RJ, MACKINNON S: Longitudinal monitoring of immune reconstitution by CDR3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire. *Blood* 2000;95:3990-5
42. MACKALL CL, HAKIM FT, GRESS RE: T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol Today* 1997;18:245-51
43. MICHALEK J, COLLINS RH, HILL BJ, BRENCHLEY JM, DOUEK DC: Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet* 2003;361:1183-5
44. DOUEK DC, VESCIO RA, BETTS MR et al: Assessment of thymic output in adults after hematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 2000;355:1875-81
45. TAYLOR PA, LEES CJ, BLAZAR BR: The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)-CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493-9
46. STOREK J, DAWSON MA, STORER B et al: Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:3380-9
47. WELTE K, CIOBANU N, MOORE MA, GULATI S, O'REILLY RJ, MERTELSMANN R: Defective interleukin 2 production in patients after bone marrow transplantation and in vitro restoration of defective T lymphocyte proliferation by highly purified interleukin 2. *Blood* 1984;64:380-5
48. GRATAMA JW, VERDONCK LF, VAN DER LINDEN JA et al: Cellular immunity to vaccinations and herpesvirus infections after bone marrow transplantation. *Transplantation* 1986;41:719-24
49. PAPADOPOULOS EB, LADANYI M, EMANUEL D et al: Infusions of donor leukocytes as treatment of Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders complicating allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:1185-1191
50. WALTER EA, GREENBERG PD, GILBERT MJ et al: Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995;333:1038-1044
51. O'REILLY RJ, LACERDA JF, LUCAS KG, ROSENFELD NS, SMALL TN, PAPADOPOULOS EB: Adoptive cell therapy with donor lymphocytes for EBV-associated lymphomas developing after allogeneic marrow transplants. *Import Adv Oncol* 1996;:149-166
52. KAYSER C, ANDRADE LEC : Disfunção tímica e suas possíveis implicações nas alterações imunológicas no lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2003;43:26-31
53. KONG FK, CHEN CL, SIX A, HOCKETT RD, COOPER MD: T cell receptor gene deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1536-1540
54. LEWIN SR, HELLER G, ZHANG L et al: Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood* 2002;100:2235-2242
55. WEINBERG K, BLAZAR BR, WAGNER JE et al: Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:1458-1466
56. IMAMURA M: Immunological reconstitution and immunoregulatory cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2002;76:191-4
57. VOLPI I, PERRUCCIO K, TOSTI A et al: Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic. *Blood* 2001;97:2514-2521
58. MACKINNON S, PAPADOPOULOS EB, CARABASI MH et al: Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86:1261-1268
59. BROERS AE, POSTHUMUS-VAN SLUIJS SJ et al: Interleukin-7 improves T-cell recovery after experimental T-cell-depleted bone marrow transplantation in T-cell-deficient mice by strong expansion of recent thymic emigrants. *Blood* 2003;102:1534-40
60. ALPDOGAN O, MURIGLAN SJ, ENG JM et al: IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Invest* 2003;112:1095-107
61. STOREK J, GILLESPIE T 3RD, LU H et al: Interleukin-7 improves CD4 T-cell reconstitution after autologous CD34 cell transplantation in monkeys. *Blood* 2003;101:4209-18
62. OKAMOTO Y, DOUEK DC, MCFARLAND RD, KOUP RA: Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function. *Blood* 2002;99:2851-8
63. MACDONALD KP, HILL GR: Keratinocyte Growth Factor (KGF) in hematology and oncology. *Curr Pharm Des* 2002;8:395-403
64. PANOSKALTSIS-MORTARI A, TAYLOR PA, RUBIN JS et al: Keratinocyte growth factor facilitates alloengraftment and ameliorates graft-versus-host disease in mice by a mechanism independent of repair of conditioning-induced tissue injury. *Blood* 2000;96:4350-4356
65. KRIJANOVSKI OI, HILL GR, COOKE KR et al: Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. *Blood* 1999;94:825-831
66. MIN D, TAYLOR PA, PANOSKALTSIS-MORTARI A et al: Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* 2002;99:4592-4600
67. ROSSI S, BLAZAR BR, FARRELL CL et al: Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100:682-691