

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Claudia Caceres Astigarraga

**Impacto da Infecção Prévia por Citomegalovírus (CMV) no Programa de Transcrição Gênica
das células CD4+ em pacientes com Doença do Enxerto-contra-o-Hospedeiro Crônico
(cDECH)**

Porto Alegre
Mai, 2015

Impacto da Infecção Prévia por Citomegalovírus (CMV) no Programa de Transcrição Gênica das células CD4+ em pacientes com Doença do Enxerto-contra-o-Hospedeiro Crônico (cDECH)

Claudia Caceres Astigarraga

Tese de doutorado apresentada como requisito obrigatório para obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Scroferneker

Porto Alegre

Maiο, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Caceres Astigarraga, Claudia
Impacto da Infecção Prévia por Citomegalovírus
(CMV) no Programa de Transcrição Gênica das células
CD4+ em pacientes com Doença do Enxerto-contra-o-
Hospedeiro Crônico (cDECH) / Claudia Caceres
Astigarraga. -- 2015.
102 f.

Orientadora: Maria Lucia Scroferneker.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. CMV. 2. cGVHD. 3. PD+1. 4. expressão gênica.
I. Scroferneker, Maria Lucia, orient. II. Título.

“Yes we can”

Barack Obama

2008

Dedicatória

*À minha família, que sempre esteve lá por mim, mesmo quando estive fisicamente ausente
por tantos anos.*

Aos meus amigos, espalhados por todos os cantos do mundo.

*Para a Saibrinho, o Camelo, a Tati e o Burger, perdão pela ausência enquanto eu acabava o
doutorado.*

AGRADECIMENTOS

Mestrado acabado em 2006. Então, o que a seguir?

Já era concursada e tinha um emprego estável, uma clínica grande, um lugar garantido no mercado de trabalho.

Então a pergunta que não calava era,: Vou ficar fazendo as mesmas coisas até me aposentar? Para uma mente inquieta como a minha, isso era quase uma declaração de morte em vida.

O doutorado não me pareceu um caminho natural na época; fazer ciência no Brasil !? Eu não me sentia apta para esta luta heróica.

Apesar da minha grande experiência profissional, mesmo com pouca idade, senti que algo estava faltando.

Inicialmente, a idéia era voltar para a Europa, ir para um grande centro transplantador de medula e, ainda, morar em Paris. Parecia uma idéia muito atraente.

Na época, o dólar mais barato que o euro me fez mudar os planos. Acabei o mestrado em novembro de 2006, e, em março de 2007, cheguei em Seattle nos EUA com o plano de passar um ano no Fred Hutchinson Cancer Research Center, um dos melhores centros de transplante de medula óssea no mundo.

Fiquei cinco anos e meio.

Cheguei numa terça e na quinta já estava vendo pacientes no Hospital da University of Washington, onde se localiza uma das melhores faculdades de Medicina dos EUA, e discutindo casos com pessoas que eu conhecia somente através de publicações científicas.

Nunca vou cansar de agradecer as pessoas que me receberam e me guiaram no início da minha jornada. A incrível paciência e bondade com esta estrangeira atrapalhada, mas rápida em aprender.

No final do meu primeiro ano no Hutch, como carinhosamente chamamos o Centro, fui contratada para ficar, e cuidei de pacientes nesse lugar único por dois anos e meio.

Mergulhei na história daquele lugar de visionários entusiasmados; aprendi tudo sobre o começo: como os pesquisadores iam para as fazendas e coletavam soro diretamente dos cavalos para fazerem timoglobulina nos laboratórios, a emoção do Dr. Thomas quando ganhou o Prêmio Nobel pelo seu trabalho em transplante de medula, como foram feitos os

primeiros transplantes do mundo e como o jeito humanizado de tratar pacientes nasceu naturalmente nesse lugar onde se pode tomar um café com um prêmio Nobel a qualquer momento, onde uma boa idéia é sempre bem-vinda e a simplicidade impera.

Discutir música clássica com o Reiner Storb, pai dos transplantes não-mieloablativos, começar o dia olhando as fotos da Hubble com o Fred Appelbaum, passar o Natal na casa da Mary Flowers, mesmo local onde foi a minha festa de despedida.

Aliás, Mary: obrigada por TUDO. Nunca poderei agradecer o suficiente todo o teu apoio.

Depois de dois anos e meio, migrei para a pesquisa como post-doc fellow na Divisão de Imunologia Clínica do Hutch.

Novas aventuras, novos amigos, trabalhando nos experimentos até as duas da manhã muitas vezes. Nunca vou esquecer quando ganhei a chave do laboratório!

Aprendi uma nova língua depois do inglês, a língua da ciência feita nesse lugar tão especial.

Lá, fui novamente muito bem recebida e descobri que tinha uma irmã italiana perdida nos EUA, Laura Tabellini, a staff scientist do meu laboratório, companheira de todas as horas e amiga para toda a vida.

Em 2011, fazia todo o sentido fazer doutorado e comecei esta jornada que acaba hoje, aqui.

De volta ao Brasil, agora me pergunto: O que a seguir?

Talvez, agora sim, seja a hora de fazer ciência no Brasil.

RESUMO

A infecção por citomegalovírus (CMV) tem efeito duradouro na distribuição dos subtipos de células T, mas pouco se sabe sobre o seu impacto na função celular. Foi realizada uma análise de expressão global gênica em células CD4+ purificadas em 38 recipientes de transplante de células tronco hematopoéticas (HSCT) (mediana de idade 48 anos; variação 20-65 anos) estudados em média cinco anos pós transplante (mediana 4.75 anos; variação 1-20 years). A população estudada incluiu 18 pacientes com GVHD crônico ativo (cGVHD) e 20 pacientes considerados tolerantes. Tolerância foi definida como ausência de sinais e sintomas de cGVHD, assim como ausência de tratamento imunossupressor (IST) por pelo menos 2 meses com seguimento de 1 ano sem tratamento imunossupressor. A expressão gênica foi medida por Illumina bead arrays. O seroestado do CMV foi definido pela sorologia pré transplante (por ELISA). Não havia evidência documentada de reativação do CMV no momento de coleta das amostras estudadas. Doze de 54 genes candidatos associados à função imune foram associados de maneira significativa com CMV+ em pacientes com cGVHD ativo ($p < 0.05$) (PDCD-1; GZMH, IFNG, PRF1, CST7, IL18RAP, ITGAM, CTSW, ITGAL, GBP1, CDKN1B, CXCR4), sendo que somente três genes (CD14; CD86; IER3) foram associados a CMV+ entre os pacientes tolerantes. A expressão de PD-1 significativamente maior em pacientes CMV+ e com cGVHD ativo foi confirmada em uma população independente através de estudos de imunofenotipagem. Os pacientes CMV+/cGVHD ativos tiveram um perfil compatível com ativação de células T efetoras, não sendo detectado com a mesma intensidade em pacientes tolerantes e pacientes CMV-/cGVHD ativos. Tendo como objetivo a latência da infecção, o citomegalovírus tentará evadir-se das tentativas do sistema imune de depuração viral, criando modificações que vão desde mudanças nos subtipos de linfócitos até a remodelação de cromatina por uma série de enzimas e microRNA. O ambiente caracteristicamente inflamatório do cGVHD, a produção aumentada de citocinas, a terapia imunossupressora e a reconstituição imune defeituosa das células T podem aumentar o risco de reativação do CMV, mesmo indetectável, seguido por supra-regulação de genes relacionados à ativação de células T e função efetora. O gene PD-1 pode estar supra-regulado em ativação de células T e função efetora, mas tem papel essencial na prevenção da expansão e função das células T efetoras, sendo um candidato alvo para a prevenção e tratamento do cGVHD. Entender o impacto do CMV na regulação de PD-1 em pacientes com cGVHD seria instrumental na implementação de novas terapias; portanto mais estudos com populações maiores são necessários para entendermos o impacto da imunomodulação secundária à infecção prévia por CMV no funcionamento das células T durante cGVHD.

Palavras-chave: CMV, cGVHD, PD+1, expressão gênica

ABSTRACT

Cytomegalovirus infection (CMV) is known to have a life-long effect on the distribution of T cell subsets, but little is known about the impact on cell function. We performed a gene expression analysis in purified CD4⁺ T cells from 38 hematopoietic cell transplant (HCT) recipients (median age 48; range 20-65) studied on average 5 years after HCT (median 4.75; range 1-20 years). The study population included 18 patients with active chronic GVHD (cGVHD) and 20 tolerant (TOL) patients. Tolerance was defined by absence of signs, symptoms of cGVHD and immunosuppressive therapy (IST) for at least 2 months and 1 year follow-up without immunosuppressive therapy. Gene expression was measured on Illumina bead arrays. CMV status was defined by pre-transplant recipient CMV serology (by ELISA). There was no recorded evidence of CMV reactivation at the time of study. Twelve of 54 candidate genes associated with immune function and inflammation were found to be associated with CMV positive serostatus in cGVHD patients at a significance threshold of $p < 0.05$ (PDCD-1; GZMH, IFNG, PRF1, CST7, IL18RAP, ITGAM, CTSW, ITGAL, GBP1, CDKN1B, CXCR4), but only three genes (CD14; CD86; IER3) were associated with CMV serostatus in TOL patients. The significant higher PD-1 expression on CD4⁺ cells of CMV+/active cGVHD patients was confirmed by immunophenotype testing in an independent population. CMV+/active cGVHD patients had a profile consistent with T effector cell activation that was not present in TOL and CMV serostatus negative/active cGVHD patients. Pursuing latency, cytomegalovirus will try to evade the immune system attempts of viral clearance creating modifications varying from changes in lymphocyte subsets to chromatin remodeling by several enzymes and microRNA. The chronic GVHD characteristic inflammatory environment, increased cytokine production, immunosuppressive therapy, and impaired T cell immune reconstitution, may increase the risk of CMV reactivation, even if not detectable, followed by up-regulation of genes related to T cell activation and effector function. The PD-1 gene can be up-regulated in T cell activation and effector functions, but it also has an essential role in preventing the expansion and function of effector cells, being a candidate target for the prevention or treatment of chronic GVHD. Understanding the CMV impact on the PD-1 regulation in active cGVHD would be key on the implementation of new therapies. Thus, more studies in larger populations are needed in order to understand CMV previous infection immunomodulation impact in T cell function during chronic GVHD.

Key words: CMV, cGVHD, PD-1, gene expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número anual de receptores de HSCT por ano nos EUA, por tipo de transplante ...	21
Figura 2: Apresentação de antígeno, MHC classe I e classe II.....	24
Figura 3: Patofisiologia do GVHD agudo.....	30
Figura 4: Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda de pele.....	32
Figura 5: Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda de pele.....	32
Figura 6: GVHD crônico ocular.....	36
Figura 7: GVHD crônico de pele.....	36
Figura 8: Viremia por CMV	50
Figura 9: Esofagite por CMV	51
Figura 10: Pneumonite por CMV	51
Figura 11: Células T anérgicas, exaustas, senescentes e tronco-like	57
Figura 12: Exemplo de bloqueio de via PD-1.....	62

LISTA DE TABELAS DA TESE

Tabela 1: Doenças Tratadas com HSCT	22
Tabela 2: Classificação do GVHD Agudo.....	31

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1: Pre-sample clinical characteristics.....	84
Table 2: Chronic GVHD classification and treatment	85
Table 3: Gene log FC values	86

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1: A heatmap shows the 12 differentially expressed genes between CMV+ and CMV-serostatus in 18 patients with active GVHD	87
Figure 2: Gating strategy for PD1+ in mature and naïve CD4; after gating on live PBMC, CD45RA was used to distinguish CD3+/CD4+/CD45RA+ (naïve CD4 Tcells) and CD45RA- (mature CD4 T cells); PD-1+ cells were gated on both CD45RA+ and CD45RA- T cells.....	88
Figure 3: PD-1 expression on naive and mature CD4 in 18 patients with GVHD.....	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

abl	Abelson leukemia viral oncogene homolog
aGVHD	doença do enxerto-contra-o-hospedeiro aguda
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AP-1	activator protein 1
APC	antigen presenting cell
BCL-6	B-cell lymphoma 6 gene
bcr	breakpoint cluster region
BCR	B cell receptor
BM	bone marrow
CD4	linfócitos T helper
CD8	linfócitos T citotóxicos
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
cGVHD	doença do enxerto-contra-o-hospedeiro crônica
CMV	citomegalovírus
CST7	leukocystatin
CTL	cytotoxic lymphocyte
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTSW	cathepsin W
CXCR4	chemokine receptor 4
DECH	doença do enxerto-contra-o-hospedeiro
DLI	donor lymphocyte infusion
EBV	Epstein-Baar virus
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
EOMES –	Eomesodermin
FasL	Fas ligand
FC	fold change
Foxp3	Forkhead box p3
GATA-3	trans-acting T-cell-specific transcription factor gene 3
GBP1=	interferon-inducible guanylate binding protein 1

GM-CSF	granulocyte—macrophage colony stimulant factor
GVHD	graft-versus-host disease
GVL	graft-versus-leukemia effect
GVT	graft-versus- tumor effect
GZMH	granzyme H
HBV	vírus da hepatite B
HCMV	citomegalovírus humano
HCV	vírus da hepatite C
HELIOS	Zinc finger protein Helios
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
HSC	hematopoietic stem cell
HSCT	allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
hsp70	hot-shock-protein 70
IER3	immediate early response 3 interactive protein 1
IFNG	interferon gamma
Ig	imunoglobulina
IL-1 α	interleukin-1alpha
IL-10	interleukin- 10
IL-12	interleukin-12
IL-13	interleukin- 13
IL-15	interleukin- 15
IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein
IL-2	interleukin- 2
IL-3	interleukin- 3
IL-4	interleukin- 4
IL-6	interleukin- 6
INF- γ	interferon gamma
IST	terapia imunossupressora
ITGAL	lymphocyte function- associated antigen 1
ITGAM	alpha M integrin

kDA	
KLRG-1	killer cell lectin-like receptor subfamily-G, member
LAG-3	lymphocyte activation gene 3
LCMV	vírus da coriomeningite linfocítica
LMA	leucemia mielóide aguda
LMC	leucemia mielóide crônica
Log	logarithmic
mHA	antígeno menor de histocompatibilidade
MHC	Major Histocompatibility complex
NF $\lambda\beta$	Nuclear fator $\lambda\beta$
NFATc1	Fator nuclear de células ativadas c1
NK	natural killer cell
PB	peripheral blood
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death 1
PDCD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed death ligand 1
PD-L2	programmed death ligand 2
PR-1	pathogenesis related protein -1
PRF1	perforin 1
SIV	vírus da imunodeficiência símea
Tbet	T-box transcription fator
TBI	Total body irradiation
TCR	T cell receptor
TGF- α	tumor growth fator alpha
TGI	trato gastrointestinal
Th-1	T helper-1
Th17	T helper 17
Th-2	T helper-2
Thf	T follicular helper
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin domain-3

TMO	transplante de medula óssea
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TOL	tolerant patients
TREC	T cell receptor excision circle
Treg	T regulatory cell
WT	Wilms tumor

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1.	TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (HSCT) NA ATUALIDADE	20
2.2.	TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO	22
2.2.1.	Tópicos em imunogenética do transplante alogênico.....	22
2.3.	DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO (GVHD OU DECH)	27
2.3.1.	Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (aGVHD)	28
2.3.2.	Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (cGVHD).....	33
2.3.3.	Tratamento de GVHD	37
2.4.	EFEITO DO ENXERTO-CONTRA-O-TUMOR (GVL OU GVT).....	37
2.5.	IMUNODEFICIÊNCIA PÓS-TRANSPLANTE.....	39
2.6.	RECONSTITUIÇÃO IMUNE PÓS TMO ALOGÊNICO.....	40
2.7.	CITOMEGALOVÍRUS	43
2.7.1.	Características do Citomegalovírus Humano (HCMV).....	43
2.7.2.	Linfócitos T CD4+ e citomegalovírus	45
2.7.3.	CMV e senescência imune.....	46
2.7.4.	CMV e autoimunidade.....	48
2.7.5.	CMV e tumores.....	48
2.8.	CMV e HSCT	49
2.8.1.	CMV , GVL e GVHD.....	51
2.9.	SENESCÊNCIA E EXAUSTÃO IMUNOLÓGICAS	53
2.9.1.	Senescência imunológica.....	53
2.9.2.	Exaustão imunológica.....	54

2.10.	VIA DE SINALIZAÇÃO COESTIMULATÓRIA PD-1/PD-LIGANTES (PD-LS)	57
2.10.1.	Introdução.....	57
2.10.2.	Estrutura, expressão e função de PD-1 e seus ligantes.....	59
3.	JUSTIFICATIVA.....	63
4.	OBJETIVOS	64
4.1.	OBJETIVO PRIMÁRIO.....	64
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA	65
6.	ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	74
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	101
9.	ANEXOS.....	102

1. INTRODUÇÃO

O citomegalovírus humano (HCMV) é um vírus membro da família dos Herpesvírus e um patógeno que infecta grande parte da população mundial (40 a 100%), dependendo predominantemente do nível sócio-econômico e raça. Há significativa diferença na soropidemiologia de HCMV entre diferentes países e dentro do mesmo país (1–3).

Transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas (HSCT) é uma opção de tratamento potencialmente curativa para uma variedade de doenças hematológicas, imunodeficiências e doenças metabólicas. O desenvolvimento das terapias imunossupressoras, profilaxias anti-infecciosas, manejo de infecções e seguimento sistematizado dos pacientes, mesmo anos após o HSCT, melhoraram significativamente o desfecho deste tipo de transplante. Apesar de todos esses avanços, o HCMV permanece como causa significativa de morbi-mortalidade pós HSCT alogênico. Colite, pneumonite e hepatite por HCMV são potencialmente letais, mas sua incidência diminuiu significativamente com a melhora dos métodos de detecção de HCMV no pós-transplante, assim como com o emprego de terapias anti-virais preemptivas, que, agora, são rotina nos centros transplantadores. Como estamos falando especificamente de citomegalovírus humano, daqui por diante, toda vez que falarmos em CMV estaremos nos referindo ao HCMV.

O CMV em geral não causa sinais e sintomas importantes na infecção primária em indivíduos imunocompetentes, mas persistência viral é a regra após infecção primária com todos os herpesvírus. O CMV pode permanecer latente durante toda a vida do hospedeiro, e, se reativações esporádicas ocorrem, estas são controladas por imunovigilância celular. Entretanto, assim como na infecção primária, a reativação do CMV em indivíduos imunossuprimidos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou pós- transplante de órgãos sólidos ou células tronco hematopoiéticas (HSCT) pode tornar-se descontrolada, frequentemente levando a elevados índices de morbi-mortalidade. Antes da terapia antiviral preemptiva, a mortalidade chegava a 90% dos casos de doença causada por CMV entre os pacientes submetidos a HSCT (4–10).

Mesmo que a prevenção da doença causada pela reativação do CMV seja a regra hoje em dia, a positividade para CMV do receptor de HSCT alogênico continua sendo um fator de

mau prognóstico, especialmente em receptores de células-tronco de doadores não relacionados com sorologia para CMV positiva sendo o doador com sorologia negativa. Este efeito estaria principalmente relacionado a efeitos imunomodulatórios do CMV, visto haver um excesso de mortalidade relacionada a infecções bacterianas e fúngicas neste grupo de pacientes (8–12).

A análise viral durante infecção por CMV em receptores de transplante de órgãos sólidos demonstrou que a causa predominante da infecção é a reativação do vírus do próprio receptor e não pelo CMV transmitido pelo órgão do doador (5).

As características das doenças mediadas por CMV em pacientes imunossuprimidos e a relação do CMV com a senescência imunológica levantaram a possibilidade de haver um papel deste vírus no desenvolvimento de doenças inflamatórias como doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e mesmo certas formas de câncer (3,8,9,13–24).

Infecção por CMV e doença-do-enxerto-contra-o-hospedeiro (DECH ou GVHD na sigla em inglês) são complicações importantes após HSCT. Doravante, usaremos a sigla GVHD para nos referirmos a doença do enxerto-contra-o-hospedeiro.

Sabe-se que o GVHD e seu tratamento imunossupressivo coloca pacientes em risco para replicação do CMV, mas o papel da replicação do CMV como causa do GVHD é controverso, e dados ligando diretamente a replicação do CMV e o desenvolvimento desta doença não foram relatados até o momento, mas existe a possibilidade de que o CMV possa “preparar o caminho” para o GVHD (13,25–35).

Apesar da morbi-mortalidade relacionada à reativação do CMV em HSCT, um estudo recente encontrou efeito protetivo da reativação do CMV na recaída de leucemia mielóide aguda (LMA) em humanos após condicionamento mieloablativo em transplante alogênico (33–35), demonstrando que a reativação de CMV, mesmo no HSCT, não tem somente impacto negativo. Na realidade, estudos recentes demonstraram que mudanças na homeostase do sistema imunológico de pacientes infectados com CMV não resultam em alteração da função imune do ponto de vista global, e que, isto, em contextos específicos, como no paciente jovem, poderia, inclusive, melhorar algumas respostas imunes (25).

Embora tenha havido extensa pesquisa no impacto da reativação do CMV no GVHD e vice-versa, muito pouco se sabe sobre o impacto da imunomodulação da infecção latente pelo CMV na patofisiologia da GVHD.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura tem três pontos focais:

1. Biologia do transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas.
2. Papel da infecção por CMV no transplante de células-tronco e em outros transplantes, na senescência e exaustão imunológicas, assim como efeito do CMV em doenças como as autoimunes e câncer.
3. Papel de PD-1 e seus ligantes no controle de ativação celular e exaustão imunológica. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed e banco de teses da CAPES, no período de 1980 a 2015. Foram realizadas buscas através dos termos "GVHD", "GVHD crônico", "CMV", "citomegalovírus", "expressão gênica", "PD-1" .

2.1. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (HSCT) NA ATUALIDADE

HSCTs são realizados na intenção de reconstituir a função da medula óssea em pacientes com alterações hematológicas e imunológicas para tratar neoplasias hematológicas, corrigir defeitos genéticos manifestados em células hematopoiéticas, permitir aumento de dose intensidade na quimioterapia, e, ultimamente como terapia tolerogênica para transplantes de órgãos sólidos.

Com a compreensão mais apurada da imunologia do HSCT, a realização desse procedimento tornou-se muito mais frequente na terapia de diversas patologias (Vide tabela 1).

Em geral, a fase inicial do transplante de HSC divide-se em fase de condicionamento com quimioterapia, irradiação corporal total (TBI), imunoterapia associada ou isolada; infusão de células progenitoras periféricas por via endovenosa; fase de aplasia; recuperação hematológica com pega do enxerto.

Existem os HSCTs singênicos, em que o doador é geneticamente idêntico ao receptor (transplante entre gêmeos idênticos), HSCTs alogênicos relacionados, em que o doador é aparentado e com complexo maior de histocompatibilidade (MHC) compatível; HSCTs alogênicos não-relacionados, em que o doador não é aparentado com o receptor, mas tem

MHC compatível; HSCTs autólogos em que o paciente tem suas próprias células coletadas previamente à quimioterapia mieloablativa através de procedimento de aférese de células progenitoras periféricas. No transplante autólogo de medula óssea, as células são coletadas diretamente da medula óssea do paciente, geralmente no quadril posterior. Este foi o primeiro método utilizado no transplante de HSCT, e, por isso, o termo transplante de medula óssea (TMO) consagrou-se pelo uso e, muitas vezes, é usado como sinônimo de transplante de células-tronco periféricas. Doravante, referiremo-nos sempre a transplante de células-tronco alogênicas (HSCT) como termo global.

Atualmente, a grande maioria dos transplantes alogênicos é realizada com coleta periférica de células-tronco do doador, aparentado ou não, através do procedimento de aférese.

No ano de 2002, regimes de condicionamento menos intensivos (mini-transplantes) foram usados em 25% de todos os transplantes, e esse número vem aumentando progressivamente desde então (36). (vide Figura 1)

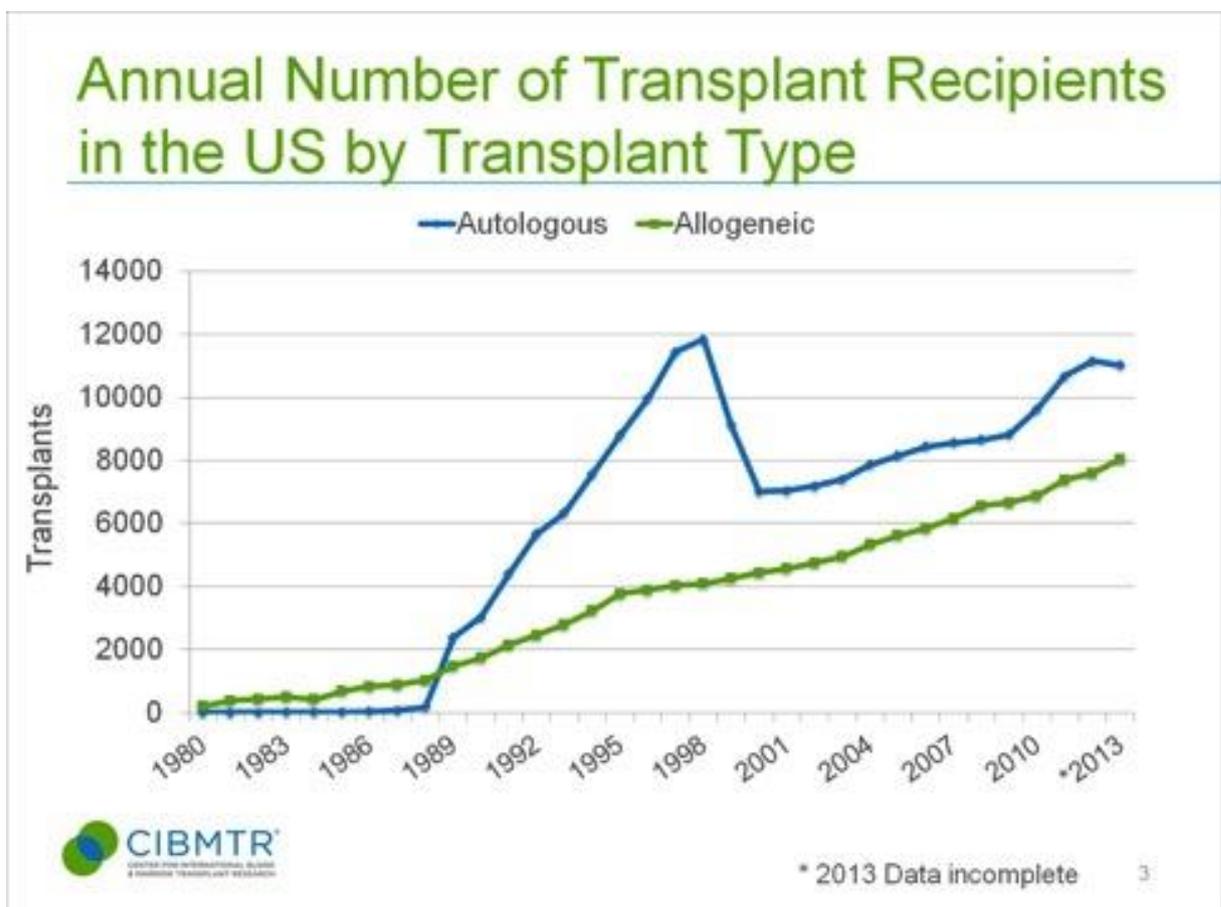


Figura 1: Número anual de receptores de HSCT por ano nos EUA, por tipo de transplante

A biologia do HSCT é determinada por três tipos celulares distintos, transplantados do doador: linfócitos T maduros, células progenitoras hematopoiéticas comprometidas com linhagem linfóide e célula-tronco hematopoiética. A biologia destes três tipos celulares define os eventos clínicos e biológicos que ocorrem no transplante de células-tronco (37).

Tabela 1: Doenças Tratadas com HSCT

Doenças Tratadas com HSCT	
Não- malignas	Malignas
Anemia Aplástica	Leucemia Mielóide Aguda
Anemia de Fanconi	Leucemia Linfóide Aguda
Síndrome de Diamond-Blackfan	Leucemia de Células Cabeludas
Anemia Falciforme	Mielodisplasias
Talassemias	Leucemia Mielóide Crônica
Hemoglobinúria Paroxística Noturna	Leucemia Linfocítica Crônica
Mielofibrose	Doença de Hodgkin
Neutropenia Congênita	Linfoma não-Hodgkin
Síndrome de Chédiak-Higashi	Mieloma Múltiplo
Doença Granulomatosa Crônica	Outros Tumores Sólidos
Trombastenia de Glanzmann	
Osteopetrose	
Doença de Gaucher	
Mucopolissacaridose	
Deficiências Imunes	
Doenças Auto-imunes	

2.2. TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO

2.2.1. Tópicos em imunogenética do transplante alogênico

2.2.1.1. O Sistema HLA no transplante.

Complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é como denominamos uma família de genes que tem função primordial no reconhecimento imune da compatibilidade tissular, ou seja, eles permitem que organismo reconheça entre o que é próprio, "self", e o que não é próprio "nonsel". As moléculas do MHC são responsáveis pela ligação e apresentação de peptídeos aos linfócitos T. Em humanos, os genes do MHC foram denominados de HLA (Human Leukocyte Antigens) (38,39). As moléculas de HLA ocorrem na maioria das células nucleadas e não são limitadas a leucócitos. Os genes

do HLA estão entre os sistemas genéticos mais polimórficos que conhecemos, o que significa que há um número extremamente grande de alelos em cada locus (em alguns casos até 100 deles), sendo que cada um destes apresenta-se com frequência relativamente alta na população. Em consequência disso, os indivíduos são geralmente heterozigotos para os loci do MHC, sendo difícil encontrar indivíduos não aparentados que apresentem os mesmos alelos nestes genes, isto é, que sejam MHC-compatíveis (40).

O sistema HLA está localizado no braço curto do cromossoma 6, e divide-se em três grupamentos genéticos distintos: Classe I, Classe II e Classe III. As moléculas de classe I incluem as proteínas HLA-A, HLA-B e HLA-C em humanos. São diméricas, compostas por uma cadeia α de 47 kDa e uma cadeia β menor (β 2-microglobulina) que é codificada por um gene fora do MHC, no cromossoma 15. A maior parte delas estende-se para fora da célula, um segmento hidrofóbico atravessa a membrana e a extremidade carboxi-terminal é intracelular. Na extremidade amino-terminal, a molécula tem uma estrutura que forma uma fenda, onde ocorrem as ligações com os peptídeos, fragmentos protéicos de nove a onze aminoácidos originados da fragmentação de proteínas e que serão, desta forma, apresentados ao sistema imune.

As moléculas de classe II são HLA-DP, DQ e DR são também diméricas, mas as cadeias são de tamanho semelhante: a cadeia α , de 32 a 34 kDa; a cadeia β , de 29 a 32 kDa, ambas codificadas por genes do MHC. Na extremidade terminal, também está presente a fenda onde se ligará o peptídeo a ser apresentado ao sistema imune.

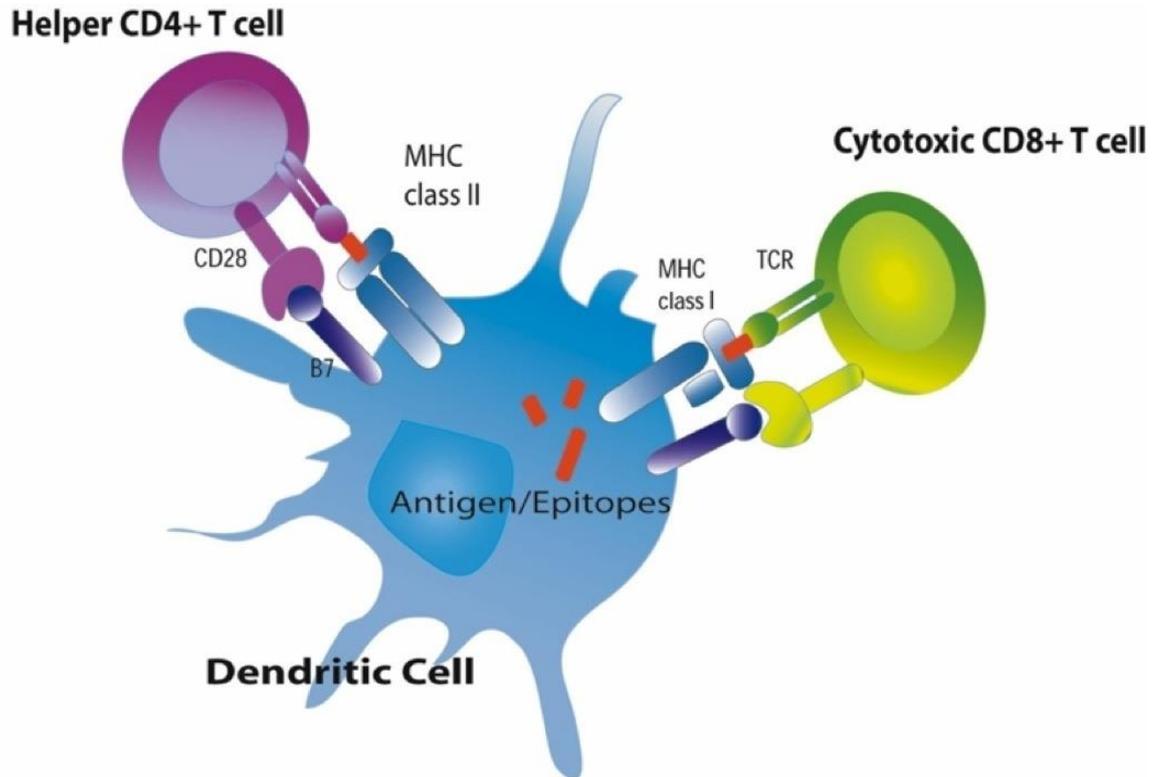


Figura 2: Apresentação de antígeno, MHC classe I e classe II
 Fonte: <http://pixshark.com/dendritic-cells-antigen-presentation.htm>

As moléculas de Classe III não apresentam uma relação tão direta com a resposta imune como as de Classe I e II e incluem componentes do sistema complemento (C2, C4A, C4B e Fator B) e a enzima 21-hidroxilase. São ainda codificadas por genes do MHC, proteínas de choque térmico (hsp70) e citocinas (fator de necrose tumoral-TNF, linfotóxina- LT e linfotóxina β - LT β).

Os receptores de antígenos em linfócitos B são as imunoglobulinas (Ig) que podem reconhecer antígenos em sua forma nativa ou solúvel, enquanto que os receptores de

linfócitos T (TCR) somente reconhecem antígenos depois que os mesmos são fragmentados por outras células e estes fragmentos (peptídios) são apresentados na superfície destas células combinados a moléculas do MHC.

Células T citotóxicas reconhecem antígeno, apresentado por moléculas de MHC classe I, pela presença da molécula CD8. Células T helper reconhecem antígenos, apresentados por moléculas de classe II, pela presença da molécula CD4 (41).

O HLA se torna especialmente importante quando considerados os transplantes de órgãos e tecidos, já que a rejeição imunológica correlaciona-se com o grau de disparidade existente entre o HLA do doador e receptor (42,43).

A rejeição de órgãos tem mecanismos imunológicos, e o papel das moléculas do MHC é tão importante a ponto de ser o que permitiu a identificação e lhe deu o nome (complexo principal de histocompatibilidade). Nos casos em que o aloenxerto difere do hospedeiro em relação a loci de classe I e II, tanto células T CD4+ como células T CD8+ são ativadas pelo reconhecimento das moléculas de MHC alogênico do enxerto. Apesar de a rejeição ser um evento frequente em transplantes de órgãos sólidos, no transplante alogênico de células-tronco, a incidência de falha de pega por mecanismo de rejeição das HSC transplantadas é relativamente baixa, porém com alta taxa de mortalidade, o que está extremamente associado com o grau de disparidade entre o HLA do receptor e do doador. Em receptores de transplante por neoplasia hematológica, com doadores HLA idênticos aparentados, a incidência é de 1-2%, sendo que este número sobe para 10-20% quando o doador é não-relacionado (39).

Não existe transplante alogênico de HSC sem tipificação e grau aceitável de compatibilidade HLA. Geralmente, todos os alelos de um loci HLA, pela sua ligação próxima, são transmitidos como uma unidade para a geração seguinte. Esta unidade, chamada haplótipo, engloba a seleção de alelos contidos no complexo HLA de um dos cromossomas 6. O pai, a mãe e o filho são usualmente haploidênticos, o que significa que compartilham um, e somente um, haplótipo HLA. Irmãos, em geral, têm uma chance de 25% de serem HLA idênticos, 50% , de serem haploidênticos e 25%, de serem completamente diferentes no que diz respeito ao HLA (38).

Para identificação, estão disponíveis técnicas sorológicas, celulares, bioquímicas e moleculares. As técnicas moleculares têm maior sensibilidade, mas os parâmetros realmente importantes para avaliação da técnica empregada são: fonte de HSC, grau de resolução e tempo necessário para realização da técnica, o número de amostras necessárias e o nível de experiência da instituição com as diferentes técnicas (39).

2.2.1.2. Resposta Th1/Th2

O sistema imune adaptativo evoluiu com o objetivo de reconhecer, discriminar e memorizar antígenos e patógenos estranhos. Para tanto, foram desenvolvidas células especializadas, capazes de capturar qualquer coisa que atravessa as barreiras epiteliais do indivíduo, iniciando uma resposta imune.

O “comandante supremo” deste sistema é o linfócito T que regula todas as operações de defesa. Os linfócitos T constituem uma população diversa. Células T helper naive (CD4+), proliferam-se e diferenciam-se em células efetoras secretoras de citocinas em resposta à ligação do TCR à plataforma MHC, com um padrão polarizado de secreção citocínica, variando conforme o tipo de antígeno. Existem duas categorias maiores destas células: uma delas (CD4+,Th2) que ativa as células B para produção de anticorpos; a outra – (CD4 +Th1) que ativa os macrófagos para imunidade mediada por célula (44).

A subpopulação de linfócitos CD4+-Th2 promove defesa contra infecções extracelulares e infecções helmínticas, enquanto a subpopulação de linfócitos – CD4+-Th1 – age contra infecções bacterianas intracelulares, fúngicas e por protozoários.

As células Th1 coordenam a ativação de macrófagos e constituem o mecanismo de defesa celular mais importante contra patógenos intracelulares. A ativação de macrófagos é mediada pelo interferon gama (INF- γ), a principal citocina produzida pelas Th1. Macrófagos ativados pelo INF- γ rapidamente destroem bactérias intracelulares suscetíveis. Com esta destruição, há produção de interferon alfa (INF- α), que tem efeito sinérgico com o INF- γ . Na indução de imunidade Th1, os macrófagos infectados produzem interleucina dois e interleucina doze (IL-2 e IL-12), que ativa as células NK e ativa a produção de INF- γ que, subsequentemente, induz a diferenciação Th1.

Existem algumas doenças que podem ser associadas com resposta desproporcional Th1 ou Th2. Uma série de condições inflamatórias in vivo, pode estar relacionada à preponderância de resposta Th1 ou resposta Th2 insuficiente. Um bom exemplo disso é a doença inflamatória intestinal. Existem relatos de doenças auto-imunes, tais como artrite reumatóide e esclerose múltipla, estarem relacionadas a patologias de Th1 ou resposta Th2 regulatória insuficiente.

A resposta Th2 estimula a resposta imune mediada por anticorpos, ativa mastócitos e leva à eosinofilia tecidual. A resposta Th2 reduz a reação inflamatória

mediada por monócitos e macrófagos, mas media respostas inflamatórias via basófilos e eosinófilos, produz IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-15, que são citocinas mediadoras de reações alérgicas. Em doenças como asma brônquica e fibrose hepática, temos preponderância de resposta imune Th2; ambas produzem IL-3, TNF- α e GM-CSF.

Usando nosso entendimento da biologia, Th1/Th2 no escopo do transplante de medula, a patogênese da doença-do-enxerto-contra-o-hospedeiro aguda (DECH ou GVHD) é, primariamente, descrita como um processo do tipo Th1 (45).

2.3. DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO (GVHD OU DECH)

Como para os demais transplantes, a maior dificuldade para o transplante de HSC alogênico é a diversidade entre as moléculas do MHC de receptores e doadores. Existem centenas de variantes de cada molécula classe I ou classe II.

Mesmo pequenas diferenças entre elas podem causar respostas de células T alorreativas que prejudicam o sucesso do transplante. Para o transplante de órgãos sólidos, o maior perigo é a rejeição do órgão transplantado pelo sistema imune do receptor, mas no transplante de HSC, a situação é diferente: a terapia mieloablativa abala o sistema imune do receptor a tal ponto, que a rejeição é um problema menor comparado à resposta imune das células T do doador contra as moléculas alogênicas de MHC do receptor (42). Quando tal situação ocorre, células T citotóxicas, efectoras, CD8⁺ do doador, reagem a antígenos do receptor apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs), e atacam os tecidos do receptor, com ativação sequencial das células T e monócitos/macrófagos do doador.

Os efeitos em cascata da produção desregulada de citocinas são manifestações inflamatórias severas, que reconhecemos clinicamente como doença do enxerto-contra-o-hospedeiro aguda (DECH ou GVHD). Sobrevidas de longo prazo também são afetadas de maneira adversa pelo GVHD crônico, que tem manifestações clínicas e patológicas diversas do GVHD agudo, mimetizando uma doença auto-imune. Os principais órgãos alvo do GVHD agudo são pele, fígado, intestino, pulmões e tecidos linfóides. O GVHD crônico, que geralmente ocorre após 100 dias do transplante alogênico, afeta os mesmos tecidos e também articulações e superfícies mucosas.

O GVHD é uma condição que varia em severidade e pode ser fatal. Mesmo quando o doador e o receptor são HLA idênticos, pode acontecer GVHD, usualmente mediado por células T que são específicas para antígenos menores de histocompatibilidade (mHa). Estes antígenos são derivados de proteínas citoplasmáticas do “self”, apresentadas por moléculas MHC classe I, da superfície celular.

São duas as características importantes do mHa: sua distribuição restrita aos tecidos e a imunodominância que alguns deles exibem. Os antígenos menores de histocompatibilidade podem ocorrer devido a polimorfismos de outras proteínas não-HLA, às diferenças nos níveis de expressão das proteínas ou diferenças genômicas entre homens e mulheres (como os antígenos H-Y, codificados pelo cromossoma Y, que podem estimular GVHD quando uma irmã doa HSC para um irmão HLA-idêntico).

Outros exemplos destes antígenos são antígenos de transmissão materna, aloantígenos epidérmicos e antígenos virais. Os antígenos virais apresentados pelo receptor funcionam como antígenos menores de histocompatibilidade no GVHD agudo, e podem explicar o risco aumentado de GVHD em pacientes submetidos a transplante alogênico previamente infectados por herpes e citomegalovírus (46).

O GVHD crônico e o agudo são mais comuns pós-transplantes com PB comparados a transplantes com BM (47).

2.3.1. Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (aGVHD)

O GVHD agudo é classificado por escore clínico que envolve órgãos e sistemas individuais e por uma classificação geral, que varia de grau I-IV, sendo a de grau I a mais leve e a de grau IV, a mais severa. A probabilidade de GVHD agudo, graus II-IV, em transplantes sem manipulação do enxerto, é de 40% para doadores HLA-genotipicamente idênticos; 50%, para doadores fenotipicamente idênticos; 75%, para mismatches em um locus; 80%, para mismatches em dois loci; 90%, para mismatches em três loci. O grau de severidade de GVHD depende do locus que é discrepante (HLA-D>HLA-A>HLA-B). Mismatches em HLA-D não são permissíveis, mas mismatches nos locus A e B podem, por vezes, ser tolerados.

A patofisiologia do GVHD agudo pode ser considerada, de maneira sequencial, em três etapas, sendo o condicionamento a fase 1, a ativação de células T, a fase 2 e os efetores inflamatórios, a fase 3, que, primariamente, é um processo do tipo Th1 (46).

A primeira fase do GVHD agudo, na realidade, ocorre antes da infusão das células do doador. As células T do doador são infundidas em um receptor que foi profundamente lesado pela sua doença base, por infecções e pelo regime de condicionamento do transplante. Todas estas situações levam a mudanças pró-inflamatórias importantes no endotélio e nas células epiteliais. Existe ativação celular e liberação de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , interleucina-1(IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas levam à supra-regulação dos antígenos do receptor e das moléculas de adesão, permitindo que as células T respondam aos antígenos do receptor. A lesão da mucosa do trato gastrointestinal, induzida pelo condicionamento prévio, permite que bactérias e endotoxinas bacterianas entrem na circulação e aumentem a secreção de citocinas inflamatórias derivadas dos macrófagos.

A segunda fase inclui apresentação de antígeno com subsequente ativação, proliferação e diferenciação das células T do doador. A alorreatividade produzida in vivo requer processos controlados pelos órgãos linfóides secundários. As células T do doador reconhecem os antígenos do receptor apresentados pelas APCs do receptor ou do doador que apresentam, de maneira cruzada, antígenos do receptor; diferenciam-se em células T helper 1 (Th1), que secreta INF- γ e IL-2. Foi demonstrado que a APC do receptor é crítica em um modelo de GVHD mediado por linfócito T CD8 em mismatch de antígeno menor de histocompatibilidade (mHa). O papel exato das APCs na indução do GVHD ainda deverá ser elucidado.

A terceira fase é uma cascata complexa de múltiplos efetores. A regulação das células efectoras para tecidos-alvo é feita por um conjunto complexo de sinais quimiotáticos onde vários receptores podem ser ativados simultânea ou sucessivamente. As células Th1 que se diferenciaram na segunda fase induzem a formação de CTLs (linfócitos T citotóxicos) e ativam as células Natural Killer (NK), células estas que atacam várias células-alvo do receptor através de FasL e perforinas. As células Th1, em resposta à estimulação das endotoxinas que entraram na circulação sistêmica através do TGI, ativam os macrófagos, levando ao aumento de produção das citocinas inflamatórias

como TNF- α , IL-1 e óxido nítrico. Estas moléculas citotóxicas atacam diretamente vários tecidos do receptor, o que caracteriza as manifestações clínicas do GVHD agudo (48,49).

Devido ao fato de as células Th1 produzirem IL-1 α e TNF- α durante o GVHD, a modulação da tempestade citocínica pode ser atingida através de inibição específica ou geral de citocinas inflamatórias, ou através de aumento da imunidade Th2, com efeito regulatório, existindo estudos em andamento sobre a regulação Th2 do GVHD (50).

Um dado interessante é a relação entre infecção viral e GVHD agudo. Estudos indicam que infecções virais podem ativar células NK levando à proliferação, blastogênese e produção de INF- γ . Esta, por sua vez, contribui para a formação de um “estado antiviral” que, por outro lado, favorece a resposta Th1 e conseqüente possibilidade de surgimento de GVHD agudo (51,52).

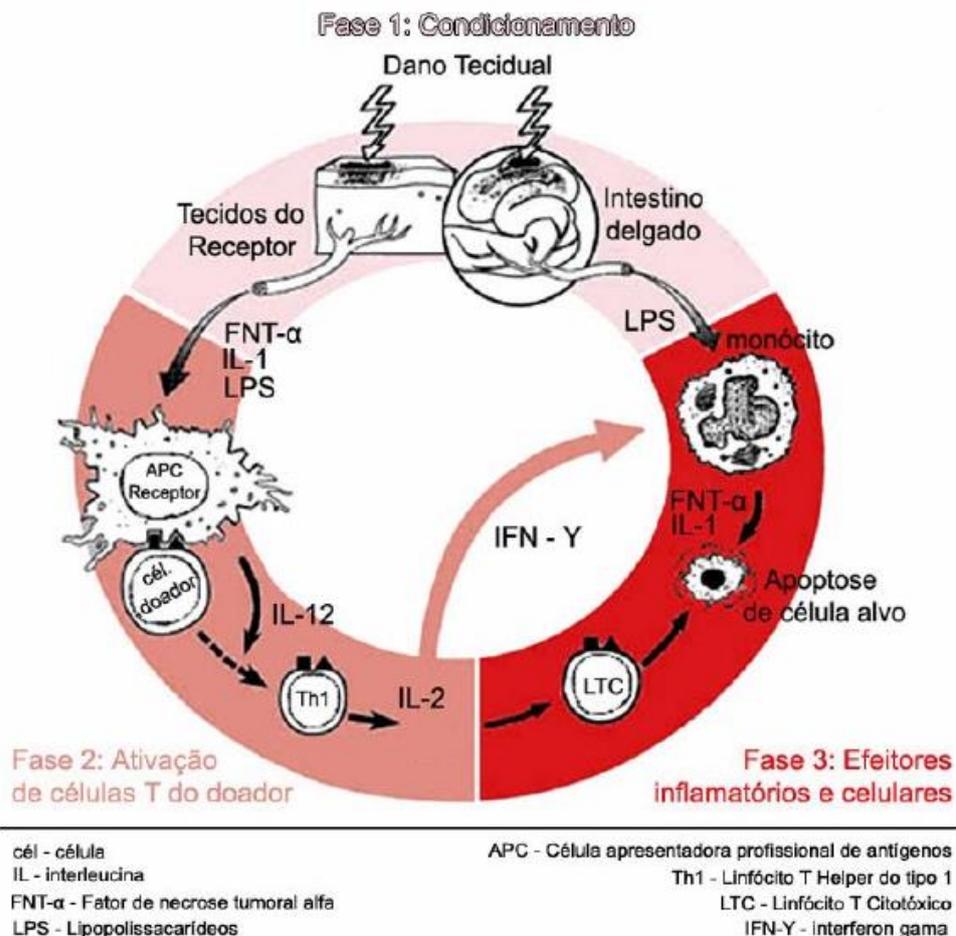


Figura 3: Patofisiologia do GVHD agudo.

Os mecanismos patológicos do GVHD como três etapas sequenciais: (1) condicionamento do receptor; (2) ativação de células T do doador, adesão, coestimulação e produção de citocinas; (3) efetores citolíticos e inflamatórios.

Fonte: Adaptado de Ferrara (43)

Em 1995 foi publicado o consenso da graduação do GVHD agudo (48):

Tabela 2: Classificação do GVHD Agudo

	Órgão/extensão de envolvimento		
	PELE	FÍGADO	TRATO INTESTINAL
Estádio			
1	Rash em 25% da pele	Bilirrubina entre 2-3 mg/dl	Diarréia > 500ml/dia ou náusea persistente
2	Rash em 25-50% da pele	Bilirrubina entre 3-6 mg/dl	Diarréia > 1000ml/dia
3	Rash em >50% da pele	Bilirrubina entre 6-15 mg/dl	Diarréia >1500ml/dia
4	Eritrodermia generalizada com formação de bolhas	Bilirrubina >15 mg/dl	Dor abdominal severa com ou sem íleo
Grau			
0	Nenhum	Nenhum	Nenhum
I	Estádio 1-2	Nenhum	Nenhum
II	Estádio 3	ou Estádio 1	ou Estádio 1
III	-	Estádio 2-3	ou Estádio 2-4
IV	Estádio 4	ou Estádio 4	-

Veja as ilustrações:



Figura 4: Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda de pele

Fonte: <http://misc.medscape.com/pi/iphone/medscapeapp/html/A429037-business.html>



Figura 5: Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda de pele

Fonte: <http://misc.medscape.com/pi/iphone/medscapeapp/html/A429037-business.html>

2.3.2. Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (cGVHD)

O GVHD crônico tem incidência global de 20 a 70% em pacientes que sobrevivem mais de 100 dias pós-transplante e sua patogênese permanece ambígua. É a maior causa de mortalidade não-relacionada à recidiva no período superior a dois anos pós-transplante. Trata-se muito mais de um processo fibrótico e o aGVHD reflete mais apoptose e necrose (53,54). A incidência de cGVHD vem aumentando. Um estudo recente demonstrou que, em torno de um ano pós-transplante, a taxa de cGVHD foi de 28% entre 1995 e 1999; 31%, entre 2000 a 2003, e aumentou para 37% no período de 2004 a 2007 ($P < 0.001$) (55).

Tradicionalmente se diferenciavam os dois tipos de GVHD pelo tempo pós-transplante do diagnóstico. GVHDs diagnosticados após cem dias do transplante, geralmente, eram crônicos; diagnósticos anteriores a esse período, geralmente, eram GVHDs agudos. Definições mais recentes apontam as manifestações clínicas como mais importantes nesta diferenciação do que o tempo pós-transplante.

O diagnóstico de GVHD agudo está altamente relacionado ao aparecimento de GVHD crônico, mas de 25 a 35% dos pacientes com cGVHD não tiveram nenhuma manifestação de aGVHD. Vinte a 30 por cento dos pacientes que tiveram diagnóstico de aGVHD não desenvolverão cGVHD (56).

Em humanos, o diagnóstico de cGVHD é extremamente raro em transplantes autólogos e singênicos, enquanto que em relação aos transplantes alogênicos, o início do cGVHD ocorre geralmente de 4 a 6 meses pós-transplante, raramente aparecendo antes do D+80 e, em menos de 5% dos casos, após um ano de transplante.

A patofisiologia do cGVHD permanece caracterizada de maneira pobre. Uma das maiores dificuldades no estudo do GVHD crônico em humanos é a dificuldade de estabelecer um modelo animal que mimetize, de maneira adequada, a doença em humanos. Existem maneiras de induzir GVHD crônico em camundongos que desenvolvem doença lupus-like, com envolvimento renal, formação de autoanticorpos e ativação policlonal de células B. Apesar de não ser relevante para modelo de GVHD em humanos (em humanos, células B do receptor não sobrevivem ao transplante e glomerulonefrite é uma manifestação extremamente pouco comum em GVHD crônico), ele demonstra

duas situações-chave no GVHD crônico em humanos: a patofisiologia desta doença depende, aparentemente, da presença constante de células T do doador alorreativas ao receptor; a ativação linfocitária, predominante, é do tipo Th2. Entretanto, vários estudos apontam diversos subtipos celulares como possíveis causadores de cGVHD, entre eles citocinas produzidas por células th-1, células th-17 e/ou auto-anticorpos.

O entendimento atual da etiologia do GVHD crônico em humanos baseia-se em que células T patogênicas do doador proliferam em resposta a aloantígenos ou autoantígenos não-verificados pelo timo normal ou mecanismos de deleção periféricos. Células críticas na promoção de tolerância podem estar ausentes no doador ou receptor. Essas células T patológicas atacam diretamente tecidos-alvo através de ataque citolítico, secreção de citocinas inflamatórias e fibrosantes, ou produção da ativação de células B e produção de autoanticorpos. O dano tecidual leva à fibrose e disfunção (57).

O timo tem um papel crítico na prevenção da autoimunidade via eliminação de células T autorreativas, sugerindo que a GVHD crônica é causada por células T autorreativas que escapam da seleção negativa no timo, que está lesado pelos regimes de condicionamento, GVHD aguda e/ou atrofia relacionada à idade. O GVHD crônico, que ocorre geralmente meses após o transplante, pode ser secundário à resposta imune Th2 a células T CD4+ do doador, que escaparam da seleção tímica negativa e que permanecem reconhecendo antígenos MHC apresentados pelas APC do receptor.

Estas células T CD4+ auxiliam as células B do receptor a sintetizar anticorpos contra vários antígenos teciduais do receptor (48).

A pele é o tecido mais frequentemente envolvido (80% das vezes). Pode ocorrer despigmentação, pápulas liquenóides, fibrose subcutânea e dérmica com alopecia. O envolvimento oral (70%) inclui líquen plano, ulcerações, atrofia e xerostomia. Olho seco é comum, podendo evoluir para ceratoconjuntivite sicca. Outras manifestações menos comuns incluem bronquiolite obliterante, sinusites de repetição, tendinites, fasciites, miosites e deficiência imunológica.

A primeira graduação de GVHD crônica foi feita em 1980 por Schulman (58) e dividida entre limitada e extensa. Em 2003, foi publicada uma nova graduação clínica com cálculo de escore com valor prognóstico (59). Finalmente, em dezembro de 2005, foi publicado o consenso em diagnóstico e estadiamento de GVHD crônico pelo projeto de desenvolvimento de consenso em critérios para ensaios clínicos em doença do enxerto

contra o hospedeiro do NIH (National Institute of Health) nos Estados Unidos. Este consenso em diagnóstico teve por objetivo definir os critérios para diagnóstico de cGVHD, propor um novo escore clínico (0-3), que descreve a extensão e a severidade do envolvimento de cada órgão ou sítio acometido em qualquer momento, levando em conta o impacto funcional, acrescido do objetivo de determinar novos guidelines para verificação de severidade de cGVHD com base no número de órgãos e sítios envolvidos e no grau de envolvimento (baixo, moderado ou severo).

A publicação destes guidelines, oportunizou a reprodutibilidade nos resultados das publicações em cGVHD, resultando em evolução do conhecimento nesta área. Por exemplo, a partir desta classificação, descobriu-se que a síndrome de overlap tem maior morbi-mortalidade do que o cGVHD clássico (57).

Vide ilustrações:



Figura 6: GVHD crônico ocular

Fonte: <http://www.clspectrum.com/articleviewer.aspx?articleID=107167>



Figura 7: GVHD crônico de pele

Fonte: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3798359_abd-88-05-0799-g03&req

2.3.3. Tratamento de GVHD

Apesar de terem acontecido muitos avanços na prevenção e no tratamento do GVHD, incluindo-se a ciclosporina, FK506 e terapias combinadas com outros imunossuppressores e anticorpos, esta síndrome continua trazendo grande morbidade e mortalidade aos pacientes submetidos a transplantes alogênicos. Novos agentes promissores estão sendo pesquisados, assim como indutores de tolerância específica a antígenos do receptor e, sem dúvida, o entendimento cada vez maior da fisiopatogenia do GVHD auxiliará no sucesso dos novos tratamentos (42,60).

2.4. EFEITO DO ENXERTO-CONTRA-O-TUMOR (GVL OU GVT)

No transplante autólogo de HSC, as células-tronco ou da medula óssea ou em sangue periférico mobilizado são coletadas de um paciente e, posteriormente, reinfundidas no mesmo indivíduo, após terapia mieloablativa. Como o doador e o receptor são a mesma pessoa, não há barreira genética neste tipo de transplante e o GVHD não é um problema. Em compensação, os níveis de recaída da doença-base e falha de pega são maiores em relação aos transplantes alogênicos. Efeito semelhante foi observado em pacientes que tiveram seu enxerto T-depletado para prevenção de GVHD agudo. Apesar de o GVHD ter sido efetivamente reduzido, a incidência de recaída e falha da pega aumentaram. Os benefícios do GVHD também foram observados em transplantes entre irmãos HLA- idênticos, nos quais respostas de linfócitos T contra antígenos menores de histocompatibilidade e, conseqüente GVHD, correlacionaram-se com maior sobrevida livre de doença. Em conjunto, estas observações indicam que algum tipo ou nível de reação GVH mediada por célula T facilita o processo da pega e da erradicação tumoral. A superioridade na pega pode ser atribuída a células T alorreativas do enxerto que “limpam” a medula óssea do receptor, atacando as células do receptor que poderiam iniciar a alorreação, ou serem efetoras dela.

A eliminação das células tumorais residuais deve-se às células T alorreativas do enxerto, que lisam células tumorais alogênicas pela expressão de alguns “alvos”HLA classe

I, compartilhados com as células saudáveis do receptor. Este tipo de resposta antitumoral é conhecido como efeito enxerto-contraleucemia ou enxerto-contratumor (GVL ou GVT) (42).

Na infusão de linfócitos do doador (DLI), também pode ser observado o efeito GVT. O efeito citotóxico do DLI é tão importante que pode levar à aplasia medular em mais de 50% dos pacientes. A dose e a frequência ótimas para DLI, ainda não são conhecidas. As infusões de leucócitos do doador estão associadas a GVHD em mais de 80% dos casos, mas nem todos os pacientes responsivos a esta terapia apresentam esta complicação, implicando a existência de mecanismos para GVL associado a GVHD e GVL independente de GVHD (61,62).

Existem muitas remissões prolongadas após transplante como resultado de efeito GVL contra moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e contra antígenos menores de histocompatibilidade (mHa). As moléculas mHa podem ser expressas em níveis variados em diversos tecidos, sendo as responsáveis pela alorreatividade entre receptores e doadores HLA-idênticos. Há demonstração de que alguns mHa conhecidos estão expressos na superfície de células de leucemia mielóide e linfóide. Os linfócitos T citotóxicos podem reconhecer e lisar estas células que expressam estes mHa “nonself”.

Como é um reconhecimento feito dentro do contexto das moléculas do MHC, este mecanismo é conhecido como citotoxicidade restrita ao MHC. Especula-se que os mHa, presentes tanto nas células normais quanto nas leucêmicas, poderiam explicar o porquê da associação próxima entre GVL e GVHD. As diferenças quantitativas na apresentação de antígeno poderiam ser responsáveis pela variabilidade na associação GVHD-GVL. Por outro lado, alguns mHa são restritos a tecidos específicos: um “antígeno menor mielóide” que estaria presente somente em células mielóides normais do receptor e em células de leucemia mielóide, e poderia provocar uma “reação anti-mielóide”, o que configuraria GVL sem GVHD. Existe, também, a possibilidade de que alguns antígenos estejam presentes somente nas células leucêmicas que também poderiam produzir um efeito GVL, sem GVHD. No futuro, técnicas especiais de depleção T talvez possam permitir a prevenção de GVHD sem perda expressiva do efeito GVL. Diferenças em moléculas de mHa associadas à hematopoese, ou a presença de antígenos associados à leucemia nas células leucêmicas do receptor podem ser utilizadas como alvos para imunoterapia (63,64).

2.5. IMUNODEFICIÊNCIA PÓS-TRANSPLANTE

O transplante de medula óssea é – frequentemente - acompanhado de imunodeficiência clínica. Vários fatores podem contribuir para a resposta imune defeituosa dos receptores de transplante, por exemplo: os pacientes com tais reações podem ser incapazes de refazer o repertório linfocitário completo e o enxerto transplantado pode não conter um número ou variedade suficiente de progenitores linfóides auto-renováveis (65).

Como consequência da imunodeficiência, os receptores de medula óssea são muito suscetíveis a infecções virais (especialmente citomegalovírus), infecções bacterianas e fúngicas. Estes pacientes também são suscetíveis a linfomas de células B ligados à infecção por Epstein-Barr vírus (EBV). A imunodeficiência de pacientes pós-transplante de medula óssea pode ser mais intensa do que a de outros pacientes imunossuprimidos. Após o transplante, o grau de imunodeficiência é influenciado pelo tipo de terapia imunossupressiva empregada e pela presença de GVHD, caso ocorra. A recuperação do estado de imunodeficiência é mais rápida após transplante autólogo, comparado a transplante alogênico. Em três meses, a maioria dos pacientes demonstra recuperação da imunidade celular T específica para herpes simples e CMV. Ocorrendo GVHD crônico, a imunodeficiência de células B e células T pode persistir por anos, prejudicando a produção de imunoglobulinas e função reticuloendotelial. Os pacientes podem receber vacinação, transcorrido o primeiro ano do transplante, e esses pacientes costumam ter boas respostas a vacinas contra influenza, pneumococco, vírus da pólio inativado, difteria, pertussis, toxóide tetânico, e vacinas conjugadas contra hemophilus do tipo B. Já os pacientes em terapia imunossupressora para GVHD crônico podem não ter respostas sorológicas adequadas. (89) Apesar de estes pacientes receberem antibióticos profiláticos de rotina e tratamento preemptivo para CMV, a morbi-mortalidade relacionada às infecções continua, assim como o GVHD, um problema maior na rotina dos pacientes transplantados com células progenitoras alogênicas (8).

2.6. RECONSTITUIÇÃO IMUNE PÓS TMO ALOGÊNICO

Nos pacientes submetidos a transplante de células-tronco alogênicas, o estabelecimento do sistema imune a partir das células do doador no receptor ocorre em fases que podem levar de meses a anos. Em pacientes que desenvolvem GVHD crônico, a recuperação imune pode jamais ser completada na sua totalidade. A primeira fase de recuperação imune se dá por um aumento da contagem de neutrófilos que ocorre de duas a três semanas após infusão de células. Embora sua função esteja aparentemente intacta, apresenta quimiotaxia alterada por um período superior a quatro meses (57). O número de monócitos retorna ao normal no sangue periférico de três a quatro semanas após o transplante. Tal função foi demonstrada, a partir do doador, 41 dias após a infusão e com função geralmente normal. Os macrófagos no pulmão e no fígado são comprovadamente do doador em torno de oitenta dias pós-transplante. A reconstituição do sistema imune-funcional, inicialmente, envolve a expansão do repertório dos linfócitos T do doador pós-tímicos com fenótipo e funcionamento não-usuais; este evento pode ser arrastado e incompleto em receptores mais idosos (66,67).

Nos primeiros meses pós-transplante de células-tronco, o repertório é dominado por células T expandidas, derivadas do compartimento de células T, do sangue periférico do doador. Neste compartimento, temos, predominantemente, células de memória central e células de memória efetora, com uma população menor de células T naive e de células efetoras finais (67).

Em pacientes submetidos a transplantes alogênicos com depleção de células T, também a reconstituição dá-se, inicialmente, através dos linfócitos T circulantes pós-tímicos do doador, e, neste caso, o repertório linfocitário é particularmente reduzido e prejudicado nos primeiros meses pós-transplante (68). Estas células pós-tímicas são grandemente responsáveis pelo sucesso ou fracasso do transplante, devido ao grande impacto na pega, GVHD, GVL e à reativação de viroses.

Em termos de alorreatividade, devemos lembrar que o repertório de células T pós-tímicas do doador teve maturação a partir de processo de diferenciação onde células T imaturas passaram pelo timo e foram selecionadas negativamente, através de apoptose induzida por antígeno, por alta afinidade com antígeno próprio, ou devido à baixa afinidade com antígeno próprio (negligência ou ausência de estímulo) (41).

No receptor do transplante, este repertório maduro encontra um novo ambiente antigênico via células apresentadoras de antígeno (APCs) do receptor. Reativações de viroses, como CMV e EBV, necessitam de nova expansão clonal de células de memória central vírus-específicas.

Há expansão massiva de células T em resposta a viroses como CMV e EBV, em resposta a antígenos menores como HA-1 e HA-2 e em resposta a antígenos expressos de forma aumentada em células leucêmicas como PR-1, BCR-ABL e Tumor de Wilms-1 (WT1). O período precoce pós-transplante é caracterizado por expansões massivas e irregulares de células T, que produzem um repertório distorcido de linfócitos (69,70).

Estudos de alorresposta de células T de doadores à estimulação antigênica do Receptor in vitro revelaram expansões importantes de células T, ocupando, praticamente, 90% do repertório de células T de um paciente morrendo de GVHD.

Também demonstraram que células de leucemia podem fazer surgir clones de células T, distintos dos clones que surgem com GVHD, provando-se molecularmente que efeitos GVHD e GVL podem ser separados.

A expansão massiva de células T pode ser explicada por forte estímulo antigênico associado a estímulo proliferativo que, por sua vez, é associado a ambiente profundamente linfopênico (homeostase linfoproliferativa). Existem especulações quanto ao fato de a resposta imune mais potente no pós-transplante envolver células de memória do doador. O fenômeno de forte interação entre os antígenos e as células T é chamado imunodominância.

A fase final da reconstituição imune envolve o surgimento de um novo repertório de células T gerado a partir dos precursores pré-tímicos do doador. Estas células processadas pelo tecido tímico do receptor são tolerantes ao alo-ambiente.

A técnica de quantificação de TRECs (círculos de excisão de receptores de células T) apresenta os linfócitos recém saídos do timo. Os TRECs são resíduos de DNA circular da recombinação dos TCR, e são evidência do rearranjo de TCR: um processo exclusivo do estágio tímico de maturação dos linfócitos T. Quando os linfócitos entram em processo de expansão pós-tímica, os TRECs ficam mais e mais diluídos a cada divisão celular. A análise dos TRECs pós-transplante de células-tronco revela diferenças, em termos de idade, na capacidade de “educar” os precursores pré-tímicos do doador no timo do receptor. Crianças e adultos jovens têm timos funcionais, altos níveis de TREC e

reconstituem um novo repertório de células T dentro de um a dois anos pós-transplante. Indivíduos idosos expressam níveis de TREC significativamente inferiores aos apresentados pelos jovens, podendo nunca chegar a reconstituir função tímica completa. Nestes pacientes, a competência imunológica continua, em grande parte, sendo atribuída ao compartimento de células T pós-tímico (71,72).

O número de linfócitos B nos primeiros meses pós-transplante é muito baixo, mas, lentamente, retoma níveis normais num prazo em torno de 9 a 12 meses. A reconstituição destas células pode levar muito mais tempo, especialmente se o paciente desenvolve GVHD crônico e requeira terapia imunossupressora prolongada.

Além disso, o repertório de células B é usualmente restrito. Avaliação sorológica pós-imunização pode ser um indicador de funcionalidade de linfócitos B, levando em consideração que a resposta depende do tipo de antígeno apresentado.

Respostas a antígenos protéicos podem recuperar-se mais rapidamente do que respostas a antígenos compostos de polissacarídeos. Cabe lembrar que a responsividade das células B está ligada à função de células T helper; se tivermos CD4 reduzidos em número e função, teremos células B prejudicadas (73). A recuperação linfocitária, de modo geral, ocorre mais rapidamente em pacientes pós-transplante alogênico de células periféricas em comparação a transplante alogênico de medula óssea (74).

Os fatores que potencialmente podem afetar a reconstituição imune pós-transplante alogênico são: imunossupressão, para tratar ou prevenir GVHD; GVHD; idade do receptor (idade tímica); dose de linfócitos T; profunda imunoablação do receptor; imunodominância; células T reguladoras; balanço Th1/Th2; fatores de crescimento como IL-2, IL-12, IL-7; quimerismo linfóide, mismatching de HLA; polimorfismos de genes de citocinas (72,75).

Natural Killers são células capazes de mediar a citotoxicidade dependente de antígeno-anticorpo reconstituindo-se até os níveis normais em torno de trinta dias pós-transplante; mas podem demonstrar função e fenótipo não usual, principalmente nas primeiras semanas pós-transplante, quando tiverem expansão maciça (73,76). Sabe-se que, mesmo em enxertos T depletados em transplantes alogênicos, a recuperação NK é a primeira a ocorrer entre os linfócitos (77). As células NK produzem linfocinas, inclusive interleucina 2 (IL-2), que podem contribuir para a recuperação da população de células T.

Em relação à recuperação imune pós-transplante de medula óssea não-mieloablativo (mini-transplante), comparada ao transplante alogênico convencional, o número absoluto de linfócitos, nos primeiros seis meses são similares; no primeiro ano, as contagens de CD4 naive e total, e CD8 naive foram maiores em pacientes pós-mieloablativo. Os níveis de anticorpos foram similares seis meses e um ano pós-transplante e também pós-vacinações. As taxas de infecção foram menores em pacientes pós-mini nos primeiros três meses, mas maiores após este período.

Aparentemente, a imunidade dos pacientes pós-condicionamento não-mieloablativo é melhor, precocemente pós-transplante, mas este dado não é verdadeiro, se comparado tardiamente com o transplante mieloablativo (48,78).

O entendimento da reconstituição imune pós-TMO alogênico é essencial para a compreensão de fenômenos como a DECH ou GVH e o efeito-enxerto-contra-leucemia (GVL ou ECL) (49,79).

2.7. CITOMEGALOVÍRUS

2.7.1. Características do Citomegalovírus Humano (HCMV)

O citomegalovírus é um membro da família Herpesviridae. A infecção primária por este vírus caracteriza-se por um período de replicação viral ativa e a presença do vírus na saliva, urina, leite materno e secreções genitais. Além da fase virêmica, em alguns indivíduos pode ocorrer uma infecção mononucleose-like. Esta infecção inicial é gatilho para o desenvolvimento de uma resposta imune ampla, envolvendo todos os braços do sistema imune adaptativo e, após várias semanas, a latência viral é estabelecida. A infecção latente tem por característica a presença de grau reduzido de replicação viral ou ausência total de replicação viral detectável, com a manutenção de genomas virais em forma de episômos em células mononucleares CD14+ e células CD34+ e CD33+ na medula, o que possibilita a reativação posterior (produção viral endógena).

A variação de sequências no extenso genoma viral do CMV possibilita grande variação genotípica do CMV e o significado clínico destas variações é desconhecido (1,59).

A definição de latência do CMV pode ser, então, operacionalmente definida como a manutenção do genoma viral, na ausência de produção de vírions infecciosos, mas com a habilidade do genoma viral ser reativado sob certas condições.

Os eventos moleculares que levam à ativação do programa de expressão gênica viral, resultando na produção de vírus lítico no paciente imunossuprimido, não são completamente entendidos. Postula-se que células latentemente infectadas com genoma viral ficam em um estado de "dormência" com expressão gênica extremamente limitada e restrita. Eventos sinalizadores, por exemplo, induzidos por citocinas pró-inflamatórias, bem como os processos de diferenciação das células com infecção latente, são associados à reativação. Nos transplantes, a reativação do CMV foi observada no contexto de reação imune como rejeição tecidual alorreativa ou doença-do-enxerto-contra-o-hospedeiro (DECH ou GVHD) (80,81).

Estudos sugerem que in vivo CMV está presente em progenitores CD34+, e que este é transportado quando essas células diferenciam-se em monócitos. Durante esse transporte, o genoma viral é mantido em forma de moléculas episomais. O motivo pelo qual outras linhagens que se originam de progenitores CD34+, como linfócitos T e B e células de origem mielóide como polimorfonucleares não transportam genoma viral é desconhecido no momento (4-7).

Durante a infecção crônica por CMV, o vírus é persistentemente liberado em níveis muito baixos e por períodos de tempo longo a partir de sítios restritos. A liberação crônica pode ocorrer secundária à infecção primária, ou pode seguir a reativação do vírus latente (2).

Antes da era da reação em cadeia polimerase (PCR), era extremamente difícil detectar o DNA do CMV nos leucócitos do sangue periférico de doadores saudáveis soropositivos. Estudos sugerem que a frequência das células carreadoras de genoma viral é extremamente baixa (<1 em 10.000 células mononucleares periféricas). Experimentalmente, a análise molecular da latência do CMV, bem como sua reativação, é difícil de analisar, mesmo em modelos de camundongos, devido ao baixo número de células latentemente infectadas e à baixa frequência de eventos de reativação (61,82).

Atualmente está claro que mecanismos virais e do próprio receptor contribuem para a persistência, latência e reativação do CMV, mas não há um entendimento completo dos mecanismos moleculares envolvidos. O CMV infecta uma série de diferentes tipos celulares em humanos, mas nem todos os distintos tipos celulares permitem a latência viral, e os reservatórios reais de CMV em humanos ainda estão por serem determinados. A maioria dos

estudos são realizados em células hematopoiéticas, mas outros tipos celulares, como células endoteliais e epiteliais, também são candidatos a importantes reservatórios com contribuição na persistência viral de maneiras não totalmente entendidas (1,2,82).

2.7.2. Linfócitos T CD4+ e citomegalovírus

As células T CD4+ tem um impacto importante no curso das infecções virais. Estas células secretam múltiplas citocinas que podem ter um efeito direto nas funções efetoras, mas também ativam outras células imunes como linfócitos T CD8+ e linfócitos B, tendo um papel único na coordenação das respostas celulares e humorais.

Em contraste com as infecções agudas que são resolvidas por respostas imunes efetivas, durante infecções crônicas e câncer, as células T perdem progressivamente a função e entram em exaustão. Altos níveis de estimulação antigênica contínua podem culminar em deleção física das células exaustas antígeno-específicas. Foi descrita exaustão celular em células CD4+ e CD8+. (35,61,62)

Muitas das informações que temos quanto à exaustão celular referem-se a células CD8+, mas as células CD4+ também perdem função efetora durante a infecção crônica viral. Células T CD4+ exaustas apresentam uma produção reduzida de citocinas efetoras (fator de necrose tumoral-TNF e interferon gama- $\text{INF-}\gamma$), e expressam altos níveis de proteína de morte celular programada-1 (PD-1). Enquanto estas características gerais são similares ao que ocorre na exaustão das células CD8+, certos aspectos da exaustão de células CD4+ são distintos. Por exemplo, células CD4+ perdem função efetora mais rapidamente do que as CD8+ no período precoce de infecções que se tornarão crônicas. Células CD4+ exaustas podem, frequentemente, produzir interleucina-10 (IL-10) e/ou interleucina-21(IL-21), e ambas citocinas são importantes na regulação negativa de IL-10 e/ou no suporte à persistência de células CD8+ (IL-21) e respostas celulares de linfócitos B.

Aparentemente há diferenças celulares importantes entre exaustão de linfócitos T CD4+ e T CD8+ durante as infecções virais crônicas. A comparação direta dos programas de transcrição das células CD4+ e CD8+ exaustas demonstram um corpo de assinatura transcricional comum a ambas as linhagens. Esse perfil molecular comum inclui receptores inibitórios e uma assinatura gênica interferon-I (INF-I). Uma diferença chave entre células

CD4+ e CD8+ exaustas é a expressão dos fatores de transcrição: expressão alterada de trans-acting T-cell-specific transcription factor gene (GATA-3), B-cell lymphoma 6 gene (BCL-6) e HELIOS que não foram observados em linfócitos CD8+. Os padrões de co-expressão proteica em fatores de transcrição de célula única, em células CD4+ exaustas, revelam uma heterogeneidade substancial nessa população, talvez sugerindo mais complexidade e diversidade nas células CD4+ exaustas do que as observadas em células CD8+ exaustas. Observações atuais sugerem um padrão de diferenciação diverso para células CD4+ exaustas, que pode incluir diferenciação para células T foliculares-T helper like (TFh), vias imunorregulatórias alteradas e uma rede distinta de fatores transcricionais (35,62,83,84).

2.7.3. CMV e senescência imune

Imunosenescência é definida como a desregulação e disfunção do sistema imune associada ao envelhecer, caracterizada por imunidade protetiva defeituosa e uma decrescente resposta à vacinação. Estudos clínicos, imunológicos e epidemiológicos sugerem que a persistência da infecção pelo CMV está associada com a aceleração do envelhecimento do sistema imune e com doenças relacionadas ao processo de envelhecimento. Não se sabe ao certo como exatamente se dá a ação do CMV no processo de envelhecimento imune (25,26,28,85).

Após a infecção primária, o CMV é carregado por toda a vida pelo hospedeiro. A persistência do vírus baseia-se em interações complexas entre múltiplos determinantes virais e do hospedeiro. Estas interações geralmente resultam num equilíbrio cuidadosamente negociado e clinicamente "inócuo" entre o vírus e o hospedeiro imunocompetente, o que não se observa em pacientes imunossuprimidos quando a reativação de CMV leva à doença por CMV com elevada morbi-mortalidade.

A co-existência de CMV em receptores saudáveis e idosos é um fenômeno ainda pouco compreendido. Por exemplo, ainda não temos medidas precisas da quantidade viral, latência viral ou reativação viral, do tipo e extensão da eficácia da imunovigilância e o relacionamento entre o vírus e o sistema imune em relação ao que realmente acontece com a infecção por CMV (latência sem replicação viral? persistência viral com replicação/reativação viral esporádica ou frequente?) (25,26,81).

Defeitos funcionais imunes podem ser causados por exposição crônica a antígenos. A imunoscenecência pode ser o resultado do desafio continuado da exposição a diversos antígenos (vírus, bactérias, mas também moléculas alimentares e auto-moléculas). A indução de memória imunológica significa resposta adequada do sistema imune, mas leva ao acúmulo progressivo de células de memória.

Uma população saudável da Etiópia foi observada como modelo de imunoscenecência por ativação antigênica crônica e comparada a indivíduos saudáveis, pareados por idade na Europa e Israel. Os etíopes têm uma expectativa de vida baixa, em torno de 41 anos, e vivem em um ambiente em que o sistema imune é continuamente desafiado, principalmente por tuberculose e parasitas intestinais.

Os etíopes HIV negativos têm o número de linfócitos T CD4+ severamente reduzidos, comparados a holandeses pareados por idade, e células CD8+ em maior número comparados a israelitas, suecos e holandeses. Os etíopes também têm um número reduzido de células T naive e aumento de células efetoras/memória comparados a holandeses. Análise adicional feita em neonatos e crianças demonstrou que a fração de células T naive cai profundamente nos primeiros vinte anos de vida. Como as células naive são as responsáveis pela iniciação da resposta imune contra novos antígenos encontrados, a sua baixa proporção nos etíopes sugere que esta redução poderia impactar, a longo prazo, na capacidade de reagir a novos antígenos. Foi observado aumento de expressão de células T CD+, e CD8+ foi observado em crianças menores que dezesseis anos, continuando elevadas em adultos etíopes, o que indica um aumento progressivo da ativação imune nessa população a partir do nascimento. Uma das explicações para o sistema imune "envelhecido" da população etíope estudada foi a exposição continuada a agentes parasitários, comuns no país.

Coletivamente, estes achados observados em linfócitos T CD8+ de indivíduos idosos, como perda de receptores co-estimulatórios e acúmulo de clones CD8+, são derivados de estimulação antigênica crônica e não do envelhecimento per se. A estimulação antigênica crônica levaria à senescência mais rápida do sistema imune. Humanos podem ter idade avançada, e este fato pode levar à dificuldade de combate às infecções devido à senescência. Porém, foi visto que humanos centenários saudáveis têm sistemas imunes preservados, mais parecidos com o sistema imune de indivíduos jovens, sugerindo que indivíduos que atingem idade avançada, na realidade, demonstram menor senescência imune (86).

2.7.4. CMV e autoimunidade

Durante a infecção aguda por CMV, frequentemente há disfunção do sistema imune, levando à imunossupressão e fenômenos auto-imunes, como produção de autoanticorpos, principalmente contra células endoteliais e células de músculo liso, embora autoanticorpos anti-nucleares, anti-fosfolipídeos e anti CD-13 também são comuns. Evidências recentes implicam que o CMV pode preceder o início da doença autoimune, mais comumente em indivíduos predispostos à autoimunidade.

O vírus aparentemente não é gatilho para a doença autoimune, mas pode ser reativado por um insulto inflamatório inicial e daí por diante sustentar e exacerbar o processo inflamatório pela produção de citocinas tipo 1 e por mecanismos específicos que induzem inflamação e reação autoimune. Por exemplo, infecção por CMV induz a expressão de ciclooxigenase-2, lipooxigenase, produção de prostaglandina E2, leucotrieno B e Interleucina-6 (IL-6), todos potentes mediadores inflamatórios.

Por definição, reações autoimunes ocorrem na ausência de patógenos nos órgãos afetados,; entretanto novas evidências sugerem que proteínas de CMV são comuns em tecidos afetados pela autoiminidade e que mimetismo molecular e antígenos virais podem sustentar reações imunes (18,21–24).

2.7.5. CMV e tumores

Agentes infecciosos são fatores causadores de alguns tipos de câncer em humanos. Vacinações e outras medidas preventivas têm impacto nas infecções relacionadas a malignidades, como no hepatoma, câncer cervical e câncer gástrico.

Nas neoplasias não atribuíveis a agentes infecciosos, a inflamação crônica subaguda tem um papel crítico na transição do precursor neoplásico para neoplasia maligna invasiva. Este período de inflamação crônica pode ser essencial no processo neoplásico que resulta em malignidade e pode ser facilitado por "promotores" que são agentes que não têm impacto oncogênico significativo em células saudáveis, mas que podem levar células pre-neoplásicas a se transformarem em malignidade, por exemplo, hepatite C causando persistente resposta imune inflamatória resultando em hepatoma e epstein-Baar-vírus (EBV), resultando em carcinoma nasofaríngeo.

CMV não foi diretamente implicado no desenvolvimento de câncer em humanos, mas tem sido detectado em uma série de tecidos neoplásicos em baixos níveis virais, levantando a possibilidade de que CMV poderia causar o mesmo tipo de “inflamação latente” vista em outros patógenos associado com câncer.

O CMV é potencialmente oncomodulatório, e foi detectado em células pré-neoplásicas e neoplásicas de gliomas, câncer de próstata, câncer colorretal, mas não em tecidos saudáveis adjacentes. A detecção de CMV em níveis reduzidos de expressão em gliomas e diversos outros tipos de câncer, tem sido chamada de “microinfecção”, todavia, este conceito ainda é considerado controverso por alguns (18,21,22,24).

O entendimento sobre inflamação crônica, microambiente tumoral, célula-tronco neoplásica, imunologia de tumores e de agentes infecciosos na patobiologia dos tumores progrediu na última década e, aparentemente, há indícios suficientes para implicar uma potencial ação do CMV na oncogênese através do efeito mediador de células CMV+ no microambiente tumoral e nas próprias células tumorais. Os mecanismos pelos quais isto ocorre não são conhecidos (19).

2.8. CMV e HSCT

A Infecção por CMV é uma das maiores causas de morbi-mortalidade após o HSCT, mesmo com o significativo progresso na prevenção da doença por CMV, nas técnicas de diagnóstico e tratamento preemptivo do CMV. A sorologia pré-transplante do doador e do receptor continuam fatores de risco importantes para o desfecho do HSCT, independentemente da terapia preemptiva.

Receptores de HSCT continuam sob risco de infecção por CMV, não somente no período precoce pós-transplante (<100 dias), como no período tardio (>100 dias). Antes da introdução do ganciclovir, a maioria das infecções ocorria entre o período da pega até 100 dias pós-transplante. A ocorrência de infecção precoce por CMV teve redução para 3 a 6% com intensa terapia antiviral, sendo que o risco de doença tardia por CMV aumentou para até 18% nos últimos anos, mesmo quando administrada terapia preventiva .

O regime imunossupressor, que permite o receptor de HSCT manter o enxerto e evita complicações do GVHD, também tem papel na epidemiologia do CMV. Pacientes tratados com

altas doses de corticoterapia (>1mg/quilograma de peso/dia), micofenolato mofetil, aloenxertos depletados de células T, timoglobulina , são considerados de alto risco para desenvolvimento de doença por CMV (Vide figuras 8-10). Receptores altamente imunossuprimidos têm reconstituição tardia ou incompleta, o que tem efeito direto na dinâmica da replicação viral in vivo. Contrário à crença de que o CMV é um vírus de replicação lenta (com base no tempo para desenvolvimento de manifestações clínicas e no crescimento lento de CMV em culturas de fibroblastos), o crescimento da carga viral aumenta in vivo com um tempo de duplicação de aproximadamente um dia em receptores de HSCT. A chance de desenvolvimento de doença por CMV é predito pela quantidade inicial de vírus e pelo aumento da carga viral. O tempo entre detecção viral e progressão para doença é extremamente reduzido em pacientes imunossupressos severos. Desta forma, a positividade de teste para CMV deve levar ao início imediato de tratamento neste grupo de pacientes. Em relação à infecção tardia por CMV em receptores de HSCT, estudos demonstraram que cGVHD e uso prévio de terapia antiviral por mais de quatro semanas são fatores de risco para doença tardia por CMV (8,9,13,33).



Figura 8: Viremia por CMV



Figura 9: Esofagite por CMV

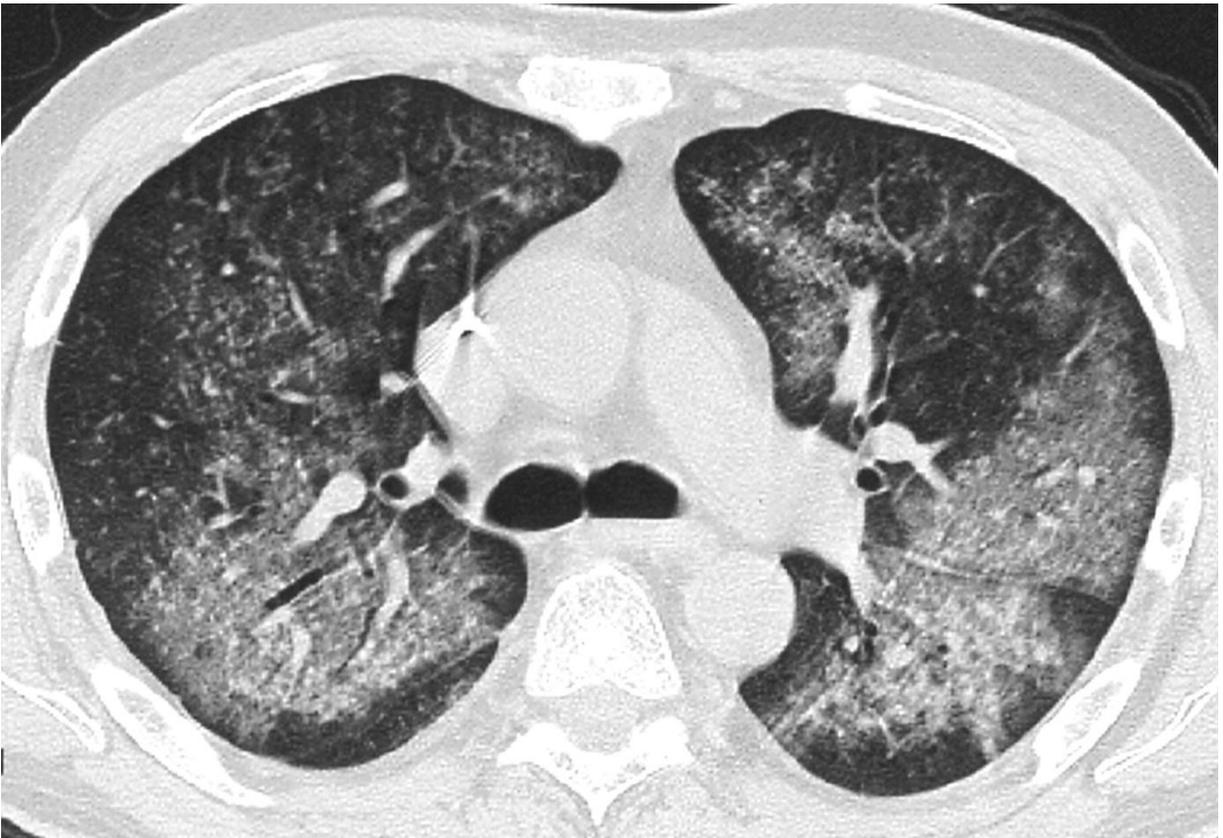


Figura 10: Pneumonite por CMV

2.8.1. CMV , GVL e GVHD

GVHD e replicação do CMV estão patogênicamente associadas e vários estudos demonstram que GVHD e seu tratamento imunossupressor colocam pacientes sob risco de replicação do CMV. Por outro lado, o papel da replicação viral como causa de GVHD é controverso. A replicação do CMV pode estar implicada no GVHD, mas dados ligando diretamente replicação de CMV e desenvolvimento de GVHD são raros (32,54,80,82,87).

Estudo em Murinos (30) demonstrou que a reativação do CMV está relacionada à severidade do GVHD, mas não requer doença ativa por CMV, fortalecendo o conceito de um relacionamento recíproco entre CMV e GVHD.

Um estudo recente (31) em humanos demonstrou risco aumentado de GVHD agudo durante a fase replicativa do CMV, demonstrando um efeito bidirecional entre a replicação do CMV e o GVHD agudo.

Outro estudo (82) em humanos demonstrou que, quando a replicação precoce de CMV era seguida por GVHD crônico, a taxa de recaída era significativamente reduzida em pacientes com LMA. Manjappa et al. (34,35) demonstraram um efeito protetivo da reativação do CMV na recaída de pacientes com LMA após condicionamento mieloablativo em HSCT, demonstrando que a infecção por CMV nem sempre tem efeito deletério, mesmo no âmbito do HSCT. Na realidade, estudos recentes demonstraram que modificações na homeostase do sistema imune de indivíduos previamente infectados por CMV não resultam numa deficiência geral de função imune e que isto, em contextos específicos, particularmente em indivíduos jovens, poderia melhorar algumas respostas imunes (25).

Embora extensa pesquisa tenha sido realizada sobre o impacto da reativação do CMV no GVHD e vice-versa, muito pouco é sabido sobre o impacto da infecção prévia por CMV na imunomodulação no processo do GVHD.

A via de morte celular programada 1 (PD-1) e seus ligantes (PD-L1 e PD-L2) tem um papel fundamental na indução e manutenção da tolerância periférica. Esta via também regula o equilíbrio entre sinais estimulatórios e inibitórios necessários para a imunidade efetiva e manutenção da homeostase celular. Contrastando com seu papel benéfico na manutenção da homeostase de células T, PD-1 media potentes sinais inibitórios que previnem a expressão e função de células T efectoras e tem um efeito deletério na imunidade antiviral e anti-tumoral. Pouco é sabido sobre como PD-1 bloqueia a ativação de células T (88–92).

Em estudo prévio (93), uma coorte de pacientes foi estudada prospectivamente para infecção e imunidade para CMV e testada retrospectivamente para expressão de PD-1 e

sugeriu que PD-1 é significativamente expresso em GVHD agudo mesmo na ausência de viremia do CMV, mas não foi observado o mesmo efeito em PD-1 entre os pacientes com cGVHD.

Em camundongos, a expressão de PD-1 foi continuamente supra regulada durante o desenvolvimento de GVHD crônico nas células T do doador, enquanto a expressão de PD-L1 nos tecidos do receptor foi transientemente suprarregulada, e declinou aos níveis basais no período tardio pós-transplante. O bloqueio da via PD-1 exacerbou o GVHD clínica e patologicamente, e a estimulação da via PD-1 melhorou o GVHD crônico (94).

2.9. SENESCÊNCIA E EXAUSTÃO IMUNOLÓGICAS

Senescência e exaustão imunológicas são duas vias sinalizadoras genéticas distintas que regulam de maneira coordenada a função e destino celular. Embora tenha havido progresso na identificação dos mecanismos que controlam ambos os processos separadamente, não é claro como tais processos se relacionam (72,95).

2.9.1. Senescência imunológica

Células T senescentes são caracterizadas por encurtamento de telomerase, alterações fenotípicas (perda de expressão de CD28) e parada do ciclo celular. Além da alteração fenotípica, células senescentes apresentam destruição celular defeituosa e desenvolvem funções regulatórias negativas. Reduzida expressão de CD28, expressão elevada de T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM-3), CD57, killer cell lectin-like receptor subfamily-G, member 1 (KLRG-1) são associados à senescência celular.

É natural que o conceito de senescência seja associado ao processo natural de envelhecimento. De fato, o linfócito tem a sua meia-vida natural e a proliferação e exaustão levam à senescência celular. Entretanto, níveis elevados de células senescentes foram encontradas em indivíduos jovens com doenças virais crônicas e doenças autoimunes, sugerindo que infecção crônica e proliferação celular podem também causar senescência (76).

O impacto do processo de envelhecimento nos subtipos de células T no sangue periférico permanece incompletamente compreendido, e deve ser distinguido da influência dos microorganismos latentes, especialmente infecções latentes por CMV. Há achados conflitantes sobre alterações em linfócitos relacionados ao envelhecimento e/ou infecções crônicas. Recentemente, um estudo com quase 400 pessoas com idades variando entre 21 e 101 anos demonstrou que o envelhecimento foi correlacionado estritamente a uma perda absoluta de células CD8+, mas não à perda de CD4+, e que o declínio das células CD4+naive foi significativo em indivíduos com sorologia positiva para CMV. Este estudo não acompanhou os indivíduos de maneira longitudinal (28).

2.9.2. Exaustão imunológica

Células T exaustas são descritas como células T efetoras com redução de expressão de citocinas e função efetora, sendo resistentes à reativação. A exaustão de células T ocorre quando estas são cronicamente ativadas em sítios de inflamação crônica, como em situações de câncer, doenças autoimunes e infecção crônica (95).

Fatores intrínsecos e extrínsecos direcionam o programa específico de expressão gênica característico de exaustão celular. Fatores extrínsecos que podem promover exaustão celular são: citocinas imunossupressoras (TGF- β e IL-10), células imunossupressoras (Tregs e células supressoras mielóides) e apresentação de antígeno alterada. Estimulação antigênica persistente induz expressão mantida de receptores inibitórios, como PD-1 que regula intrinsecamente a exaustão celular de linfócitos T (33,35,61,62).

O estado de exaustão desenvolve-se de maneira progressiva e é caracterizado pela inabilidade de elaborar a ordenação típica das funções efetoras associadas com células efetoras e de memória típicas (33,35,96,97).

A perda de expressão da interleucina-2 (IL-2) é um dos primeiros sinais de exaustão. Subsequentemente, a produção de outras citocinas, incluindo interferon alfa (INF- α) é abolida. Entretanto, o INF- β e a beta-chemoquina são mais resistentes à inativação, embora sua expressão também seja extinta em subtipos celulares mais severamente exaustos. A extensão

da exaustão varia dependendo do tipo de infecção e, em geral, correlaciona-se com a quantidade de inóculo viral.

Tem ficado cada vez mais claro que o programa transcricional difere dramaticamente comparando células exaustas, células efetoras funcionais e células de memória. Vários estudos originalmente identificaram os caminhos transcricionais imunorregulatórios operando nas células em exaustão como o da morte celular programada-1 (PD-1), que regula negativamente a função de células T. Notavelmente, células T ativadas e células T efetoras em estágios iniciais podem expressar PD-1 e permanecer funcionais.

Os parâmetros que influenciam o desenvolvimento e a manutenção do estado de exaustão incluem o nível de antígeno que é influenciado pela extensão e velocidade da replicação viral. Fatores facilitadores são: a disponibilidade de células T CD4+, a robustez da resposta imune NK, a qualidade e característica das células apresentadoras de antígenos (APCs), o engajamento das vias de receptores co-inibitórios como PD-1/PD-L1/2 e os níveis e composição do milieu de citocinas.

O nível e duração da exposição antigênica durante as infecções virais persistentes são fatores primários que direcionam o desenvolvimento da exaustão de células T. Infecções virais de alto grau como a do vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) persistente em camundongos adultos e vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e vírus do HIV têm exaustão celular mais pronunciada. Infecções como Epstein-Baar (EBV) e CMV, que persistem mas não produzem uma ativação antigênica marcada e prolongada, são associadas com fenótipos intermediários de exaustão. Por outro lado, infecções virais agudas que são completamente resolvidas, incluindo influenza, febre amarela e vaccinia resultam em indução de resposta efetora robusta e produção de células de memória duráveis (33,35,96,97).

PD-1 está suprarregulado em células T vírus específicas em diversas infecções virais crônicas, incluindo vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência adquirida em humanos (HIV), vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) e vírus da imunodeficiência símea (SIV) e tem função de restringir a habilidade proliferativa e função dos linfócitos T. Durante estas infecções, o locus do PD-1 é demetilado, enquanto que os linfócitos T são ativados e sucumbem à exaustão. Estas alterações epigenéticas são retidas em células exaustas, mesmo que o nível de antígeno seja reduzido, o que difere do padrão das populações convencionais de células de memória, que remetilam as zonas reguladoras de PD-

1. Aparentemente, distintos padrões transcricionais regulam PD-1 de maneira diferenciada em células T efectoras, de memória e exaustas.

Embora a suprarregulação sustentada de PD-1 seja uma característica proeminente das células em exaustão, outros receptores inibitórios são expressos, também, com função reguladora negativa de linfócitos T, como a molécula de TIM-3, assim como PD-1 é suprarregulado de maneira transitória em linfócitos CD8+ vírus específico durante infecções virais agudas e permanece elevado em células exaustas.

Em resumo, é questionável, mas experimentalmente operacional, se PD-1 possa ser um marcador de exaustão e Tim-3 e KLRG-1 sejam marcadores de senescência celular. Entretanto, estes marcadores não são mutuamente exclusivos ou inclusivos num subtipo linfocitário único. Embora estas células sejam conceitualmente distintas, elas podem ser funcional e fenotipicamente superpostas. Células que expressam PD-1 podem expressar Tim-3 e LAG-3. Independente destes diversos conceitos imunológicos, é evidente que os caminhos de sinalização gênica B7-H1/PD-1 e Tim-3/galectina-9 podem, sinérgica ou aditivamente, mediar a disfunção de célula T e o bloqueio simultâneo destes caminhos de sinalização gênica pode resultar em melhora da imunidade para tumores, por exemplo.

É bastante provável que estes subtipos linfocitários são gerados e definidos funcionalmente. Logo, padrões genéticos e funcionais e não marcadores fenotípicos vão definir sua natureza e destino celular.

Estudos metabólicos recentes demonstraram que células T CD8+ senescentes usam preferencialmente o metabolismo glicolítico. Por outro lado, o metabolismo lipídico é crucial para as células T CD8+ efectoras de memória (10,12,61,95–97).

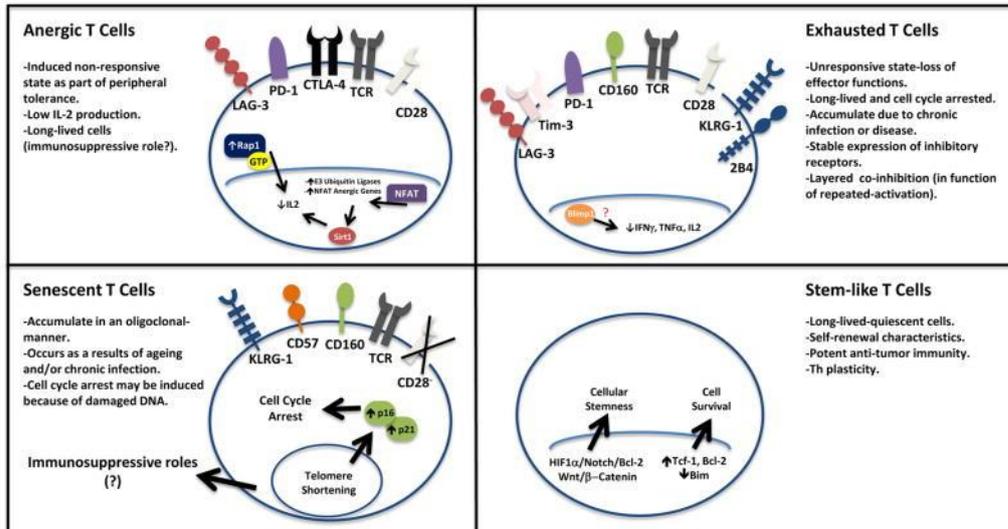


Figura 11: Células T anérgicas, exaustas, senescentes e tronco-like

Características gerais para células T anérgica, exausta senescente e tronco-like (Modelo descrito por Joel Crispo)

a) Células T anérgicas são células estimuladas com baixo sinal co-estimulatório e/ou elevado sinal co-inibitório. Estas células são irresponsivas a subsequentes condições de estimulação com expressão limitada de IL-2. (b) Células T exaustas são células que perderam suas funções efetoras incluindo expressão de citocinas efetoras por estimulação repetida. Estas células expressam múltiplos receptores regulatórios. (c) Células T senescentes são descritas como irresponsivas/ células T terminalmente diferenciadas. O marcador desta célula é a parada do ciclo celular junto com expressão limitada de CD28 e/ou níveis elevados de expressão de receptores regulatórios. (d) Células T tronco-like podem ter um fenótipo naïve ou de memória. Vale salientar que estas células têm capacidade de autorrenovação, têm resposta anti-tumoral aumentadas e são células efetoras de sobrevivência longa.

Source: Crespo (95)

2.10. VIA DE SINALIZAÇÃO COESTIMULATÓRIA PD-1/PD-LIGANTES (PD-LS)

2.10.1. Introdução

O sistema imunológico tem a difícil tarefa de discernir e se defender de uma série diversa de patógenos microbianos, enquanto simultaneamente evita a autorreatividade. Enquanto os mecanismos de tolerância central resultam na deleção da maioria dos linfócitos T autorreativos, algumas células T específicas para auto-antígenos escapam para a periferia. Para controlar o desenvolvimento de autoimunidade, diversos mecanismos de tolerância periférica se desenvolveram, incluindo anergia de células T, deleção de células T e supressão por células T regulatórias (Tregs). A falha de qualquer um destes mecanismos periféricos pode levar à doença autoimune. As vias de sinalização coestimulatórias de células T têm um papel crítico na delicada regulação do equilíbrio entre imunidade protetora e tolerância (54).

O campo da coestimulação de linfócitos T começou com o modelo de ativação de duplo sinal, que foi proposto originalmente para explicar como o encontro entre linfócito T naive e antígeno poderia levar à ativação ou anergia (hiporresponsividade antígeno-específica). De acordo com este modelo, a ativação efetiva do linfócito T naive requer dois sinais entregues pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). O primeiro sinal confere especificidade da resposta imune, e envolve reconhecimento antigênico provido pela interação do peptídeo antigênico/ MHC com o receptor de célula T (TCR). O segundo sinal antígeno independente é o "sinal coestimulatório" entregue pelas moléculas co-estimulatórias expressas nas APCs aos receptores expressos nas células T. De acordo com este modelo, se o linfócito T recebe somente o sinal da estimulação antígeno específica do TCR na ausência de coestimulação, o resultado será anergia a desafio antigênico subsequente. O papel crítico da coestimulação na resposta imune levou a avanços expressivos na identificação e caracterização das vias de sinalização coestimulatórias. Atualmente, sabemos que as vias de sinalização coestimulatórias podem fornecer segundo sinais positivos, que promovem a ativação de células T, bem como segundo sinais negativos que levam à inibição da ativação de linfócitos T, mediam a tolerância de linfócitos T e previnem a autoimunidade. Além disso, as vias coestimulatórias não regulam apenas os linfócitos T naive, mas também podem controlar linfócitos efetores de memória e linfócitos T regulatórios. As vias de sinalização coestimulatórias podem prevenir a resposta da célula T efetora e promover o desenvolvimento e função das Tregs, bem como controlar o destino das células T naive ao encontrar peptídeo antigênico (4,5,98–100).

A via de coestimulação de receptor (CD279) de morte programada-1 (PD-1) e seus ligantes, PD-L1 (B7-H1;CD274) e PD-L2 (B7-DC;CD273), entregam sinais inibitórios que regulam o equilíbrio entre ativação de célula T, tolerância e dano tecidual imuno-mediado. Esta via exerce uma função inibitória crítica no cenário de estimulação antigênica persistente, como no encontro de autoantígeno, infecção viral crônica e tumores. A via de sinalização PD-1/PD-L contribui diretamente para a exaustão celular e ausência de controle viral em infecções crônicas e ausência de controle do microambiente tumoral. Esta via controla múltiplos pontos de checagem que previnem a autoimunidade (10–14,53,54,56,58,91,96,101).

2.10.2. Estrutura, expressão e função de PD-1 e seus ligantes

O receptor inibitório PD-1 (PD-1; CD279) é uma molécula de superfície celular com domínio único da superfamília de imunoglobulina (Ig) e um domínio citoplasmático contendo dois temas sinalizadores baseados em tirosina: um tema inibitório baseado em tirosina (ITIM) e um imunorreceptor com tema interruptor baseado em tirosina (ITSM) (102).

PD-1 tem dois ligantes, PDL-1 (B7-H1; CD274) e PDL-2 (B7-DC; CD273). PD-1 tem sua expressão induzida em células T e B após ativação, células NK, células NKT, monócitos ativados e alguns subtipos de células dendríticas. PD-1 é suprarregulado após o contato do BCR ou TCR com linfócitos naive, e a estimulação antigênica persistente mantém a expressão de PD-1. As interleucinas IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 e os interferons podem potencializar a expressão de PD-1 nos linfócitos T. A expressão de PD-1 é, em parte, mediada pelo recrutamento do fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1) no núcleo. NFATc1 juntamente com AP-1 e NF- κ B são os fatores de transcrição mais criticamente ativados no reconhecimento antigênico por células T. É interessante observar que a Ciclosporina-A reduz a expressão de PD-1 via seu efeito em NFATc1. A expressão de PD-1 in vitro em células T naive ocorre 48 horas após estimulação com anti-CD3 ou anti-CD3/anti-CD28. Em células T alogênicas CD4+, a expressão de PD-1 aumenta progressivamente após transplante de pele in vivo, atingindo seus picos dez dias pós-transplante. O nível de expressão de PD-1 pós-transplante em diferentes subtipos celulares pós-transplante, em diferentes momentos pós-transplante ainda não foi determinado. Certos subtipos de células T expressam altos níveis de PD-1, incluindo CD4+ Foxp3+ células T regulatórias (Tregs), células auxiliares T foliculares (Tfh), células T de memória e células T em exaustão (89,91,102,103)

PDL-1 tem uma expressão ampla, enquanto PDL-2 tem uma expressão mais restrita. PDL-1 é constitutivamente expresso em linfócitos T e B murinos, células dendríticas, macrófagos, células mesenquimais e mastócitos derivados de medula óssea, e é expresso em altos níveis induzido por inflamação. Pode também ser induzido em células não-hematopoiéticas como células endoteliais vasculares, células musculares, hepatócitos, células placentárias e células de ilhotas pancreáticas. Em humanos, PD-1 é, principalmente, uma molécula induzível. PDL-2 é suprarregulado em células dendríticas, mastócitos derivados de medula óssea, células do centro germinativo. PDL-2 é também expresso em células endoteliais e linfócitos em humanos, mas não em murinos.

A função principal da via de coestimulação PD-1/PDL-1 é a inibição de função de célula T através do engajamento do receptor PD-1 nas células T nos ligantes PDL-1 ou PDL-2 nas APCs. PD-1 transduz um sinal inibitório quando ligado por seus ligantes na presença de ativação de BCR ou TCR (102).

A sinalização através de PD-1 exerce um grande efeito sobre a produção de citocinas pelos linfócitos T, inibindo a produção de INF- γ , fator de necrose tumoral-TNF e interleucina-2. PD-1 pode também inibir a proliferação dos linfócitos T bem como a expressão de Tbet, GATA-3 e Eomes, que estão associados à função efetora dos linfócitos T. Um forte sinal positivo através de CD28 e/ou receptor de IL-2 podem se sobrepor ao efeito inibitório da sinalização PD-1, na proliferação celular, diferenciação e sobrevivência dos linfócitos T. PD-1 também está implicado na reversão do "sinal de parada" que é mediado pela sinalização através do TCR. Isto significa que, na presença de PD-1, as células T têm um menor tempo de interação com as APCs, o que pode levar à diminuição de ativação de célula T e também favorecer a indução de células Tregs (97).

O PD-1 também pode inibir a sinalização através de receptores de células B (BCRs). O papel de PD-1 no controle da produção de anticorpos pode estar relacionado diretamente ao PD-1 nas células B ou ser secundário aos efeitos de PD-1 nas células T. As interações de linfócitos T com linfócitos B envolvem reconhecimento antigênico pela células T-helper, que, por sua vez, estimulam expansão de células B, troca de isótipo e afinidade de maturação.

Dentre os linfócitos T, os linfócitos T auxiliares foliculares (Tfh) são chave no suporte à resposta imune de linfócitos B. Tfh expressam altos níveis de PD-1 e PD-L1, e PD-L2 são suprarregulados nas células B do centro germinativo. A deficiência de PD-1 pode levar à geração de um número aumentado de células Tfh com fenótipos aberrantes que levam ao descontrole da seleção de linfócitos B e consequente ausência de regulação de diversidade de anticorpos nos centros germinativos.

A expressão PD-1 em monócitos e células dendríticas levantou a possibilidade de a sinalização, através de PD-1, poder ocorrer independentemente da sinalização através de estimulação antigênica de TCR ou BCR, possivelmente através de outras vias de sinalização.

A via PD-1 é crítica para a autotolerância. PD-1 regula a seleção tímica e a tolerância periférica. PD-1 tem papel inibidor na seleção positiva de timócitos durante a transição de células duplo-negativas para CD4⁺/CD8⁺. A função de PD-1 na seleção negativa é menos clara.

A interação PD-1/PD-L1 são requisitos para a indução e a manutenção de tolerância via células CD4+. Quanto às células CD8+, tem sido especulado que PD-1 pode inibir a expansão de células CD8+ autorreativas potencialmente patogênicas, durante a reconstituição homeostática em ambientes linfopênicos. Aparentemente, PD-1 tem papel crítico na regulação da proliferação homeostática, principalmente dos emigrantes tímicos recentes (RTE). A preservação de uma via PD-1 intacta pode ser importante para a prevenção de autoimunidade em pacientes em processo de reconstituição imune pós-linfoablação em transplantes de órgãos sólidos e HSCT.

Entender os mecanismos imunorregulatórios em transplantes é fundamental para o desenvolvimento de intervenções que possam melhorar a sobrevivência do enxerto. A sinalização coinibitória é importantíssima na regulação da resposta aloimune contra o órgão transplantado. Em particular, alguns estudos demonstraram que uma interação PD-1/PD-L1 intacta é importante na indução e manutenção da tolerância ao enxerto.

GVHD é uma das complicações mais temidas do HSCT, e células infiltradas por PD-1+ são encontradas com frequência aumentada em múltiplos órgãos alvo de GVHD (baço, cólon e fígado). Estudo recente demonstrou que a deficiência da via PD-1/PDL-1 aumenta a letalidade do GVHD em modelo animal (104). Além disso, em um modelo de leucemia mielóide aguda (LMA), a transferência adotiva de células T citotóxicas reativas à LMA foram mais efetivas em erradicar o tumor após bloqueio PD-1. Embora o bloqueio de PD-1 possa aumentar a resposta antitumoral, o bloqueio desta via inibitória pode ser deletério no HSCT pela piora do GVHD.

Dados pré-clínicos sugerem que agonistas PD-1 podem não ser suficientes para prevenir a rejeição de enxerto, e que a combinação de terapia com CTLA-4 Ig pode ser necessária (64,89,98,102,103,105).

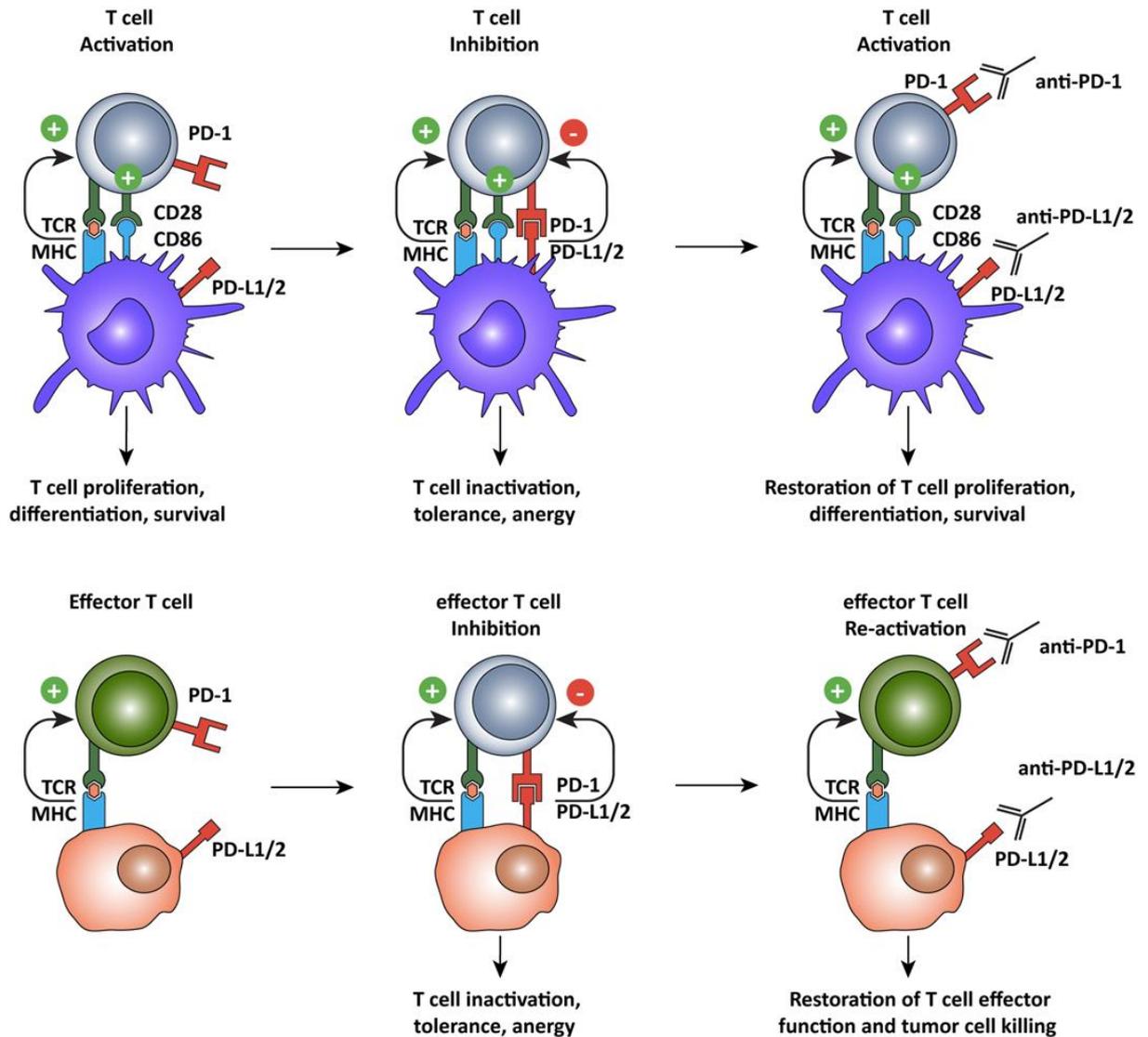


Figura 12: Exemplo de bloqueio de via PD-1

O bloqueio da via PD-1 promove ativação de células T-tumor específica e eliminação de células tumorais. A via PD-1 opera em dois níveis diferentes, regulando ambas: a ativação das células T pelas células dendríticas e função efetora pelas células T-antígeno-específicas. O bloqueio da via do PD-1 por anticorpos monoclonais contra PD-1, ou seus ligantes, promove a ativação de células T modificando o equilíbrio dos sinais das células dendríticas de inibitórios para ativadores. No microambiente tumoral, células T tumor-específicas reconhecem as células tumorais e são subsequentemente inativadas pela expressão de PD-L1 ou PD-L2 na célula tumoral, induzindo tolerância e anergia. Quando resgatadas pelo bloqueio da via PD-1, as células T reconhecem o antígeno na periferia e, na ausência da ligação de PD-1, assumem a completa função efetora e eliminam as células tumorais.

3. JUSTIFICATIVA

Infecção por citomegalovírus humano (HCMV) e doença-do-enxerto-contra-o-hospedeiro (DECH ou GVHD, na sigla em inglês) são complicações importantes após transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCT).

Sabe-se que o GVHD e seu tratamento imunossupressivo colocam pacientes em risco para replicação do CMV, mas o papel da replicação do CMV como agente causador no GVHD é extremamente disputado na literatura.

Apesar da morbi-mortalidade relacionada à reativação do CMV em HSCT, a percepção da infecção por CMV, como sempre deletéria no HSCT, está mudando. Estudos recentes demonstraram que a replicação precoce de CMV pós HSCT foi considerada um fator independente na redução do risco de recaída de leucemia em pacientes pediátricos com leucemia mielóide aguda e síndromes mielodisplásicas, e em adultos em leucemia mielóide crônica e leucemia mielóide aguda.

O GVHD crônico é a maior causa de mortalidade não-relacionada à recaída no período superior a dois anos, e sua incidência vem aumentando progressivamente. Entre 1995 e 1999, a incidência era de 28%, já entre 2004 e 2007 aumentou para 37%, até um ano pós-transplante. Novas terapias para GVHD crônico são extremamente urgentes e o maior entendimento do efeito imunomodulador do CMV no GVHD crônico nos possibilitaria um maior entendimento sobre a patofisiologia desta doença e talvez ferramentas no delineamento de novas terapias.

4. OBJETIVOS

- Verificar o impacto da infecção prévia por citomegalovírus em pacientes pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas que desenvolveram ou não GVHD crônico.

4.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

- Verificar o impacto da infecção por citomegalovírus em pacientes que desenvolveram ou não GVHD crônico, comparando a expressão gênica global de células CD4+ entre pacientes citomegalovírus positivo ou negativo, previamente ao transplante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “Silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):86–102.
2. Goodrum F, Caviness K, Zagallo P. Human cytomegalovirus persistence. *Cellular Microbiology.* 2012. p. 644–55.
3. Slobedman B, Stern JL, Cunningham AL, Abendroth A, Abate DA, Mocarski ES. Impact of human cytomegalovirus latent infection on myeloid progenitor cell gene expression. *J Virol.* 2004;78(8):4054–62.
4. Poole E, Wills M, Sinclair J. Human Cytomegalovirus Latency: Targeting Differences in the Latently Infected Cell with a View to Clearing Latent Infection. *New J Sci [Internet].* 2014;2014:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/njos/2014/313761/>
5. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology.* 2006. p. 1763–79.
6. Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2008. p. 297–313.
7. Sinclair J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol.* 2008;41(3):180–5.
8. Boeckh M, Murphy WJ, Peggs KS. Recent Advances in Cytomegalovirus: An Update on Pharmacologic and Cellular Therapies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;
9. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2003. p. 543–58.
10. Dalgleish AG, O’Byrne KJ. Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer. *Advances in Cancer Research.* 2002. p. 231–76.
11. Yao ZQ, Moorman JP. Immune exhaustion and immune senescence: Two distinct pathways for HBV vaccine failure during HCV and/or HIV infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* 2013. p. 193–201.
12. Schurich A, Henson SM. The Many Unknowns Concerning the Bioenergetics of Exhaustion and Senescence during Chronic Viral Infection. *Front Immunol [Internet].* 2014;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00468/abstract>

13. Peggs KS, Mackinnon S. Cytomegalovirus: The role of CMV post-haematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004. p. 695–701.
14. Ljungman P. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2014;21(6):466–9. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00062752-201411000-00004>
15. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: An EBMT megafile analysis. *Blood*. 2003;102(13):4255–60.
16. Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*. 1997;91(1):119–26.
17. Schottstedt V, Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, et al. Human Cytomegalovirus (HCMV) – Revised*. 2010;37(6):365–75.
18. Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *Journal of Internal Medicine*. 2006. p. 219–46.
19. Soroceanu L, Cobbs CS. Is HCMV a tumor promoter? *Virus Res*. 2011;157(2):193–203.
20. Johnsen JI, Baryawno N, Söderberg-Nauclér C. Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? *Oncotarget* [Internet]. 2011;2(12):1329–38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3282090&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Söderberg-Nauclér C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol*. 2008;41(3):218–23.
22. Söderberg-Nauclér C. Autoimmunity induced by human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*. 2012. p. 101.
23. Miller-Kittrell M, Sparer TE. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Viol J*. 2009;6:4.
24. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *BioMed Research International*. 2014.
25. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akbar A, Arens R, Chiu YL, et al. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2014;55:54–62.

26. Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res.* 2011;157(2):175–9.
27. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Effros R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Is immunosenescence infectious? *Trends in Immunology.* 2004. p. 406–10.
28. Wertheimer AM, Bennett MS, Park B, Uhrlaub JL, Martinez C, Pulko V, et al. Aging and cytomegalovirus infection differentially and jointly affect distinct circulating T cell subsets in humans. *J Immunol [Internet].* 2014;192(5):2143–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24501199>
29. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck-Loebenstien B, et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest.* 2009;119(10):3070–8.
30. Palaniyandi S, Radhakrishnan SV, Karlsson FJ, Stokes KY, Kittan N, Huber E, et al. Murine Cytomegalovirus Immediate-Early 1 Gene Expression Correlates with Increased GVHD after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Recipients Reactivating from Latent Infection. *PLoS One.* 2013;8(4).
31. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(9):1309–14.
32. Kansu E. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* 2004;79(3):209–15.
33. Elmaagacli AH, Steckel NK, Koldehoff M, Hegerfeldt Y, Trenschele R, Ditschkowski M, et al. Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: Evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2011;118(5):1402–12.
34. Manjappa S, Bhamidipati PK, Stokerl-Goldstein KE, DiPersio JF, Uy GL, Westervelt P, et al. Protective effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia patients is influenced by conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant [Internet].* 2014;20(1):46–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120526>
35. Elmaagacli AH. CMV and Relapse: What Has Conditioning to Do with It? *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2014;20(1):1–2.
36. Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) [homepage da internet] Minneapolis: CIBMTR. [Internet]. 2006 [cited 2015 Dec 17]. Available from: www.ibmtr.org
37. Hansen JA. T-cell alloreactivity in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(2 SUPPL. 2):24–7.

38. Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood*. 2013. p. 1863–72.
39. Petersdorf EW. Genetics of graft-versus-host disease: The major histocompatibility complex. *Blood Rev*. 2013;27(1):1–12.
40. Warren EH, Zhang XC, Li S, Fan W, Storer BE, Chien JW, et al. Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood*. 2012. p. 2796–806.
41. Von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*. 2000;343(14):1020–34.
42. Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):108–22.
43. Teshima T, Ferrara JLM. Understanding the alloresponse: New approaches to graft-versus-host disease prevention. *Seminars in Hematology*. 2002. p. 15–22.
44. Akpek G, Via C, Vogelsang G. Clinical Spectrum and Therapeutic Approaches to Chronic Graft-vs.-Host Disease. 2004. p. 555–608. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b14165-21>
45. Iwasaki T. Recent advances in the treatment of graft-versus-host disease. *Clin Med Res*. 2004;2(4):243–52.
46. Apperley J. Chapter 13 - Graft-versus-host-disease. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation, The EBMT Handbook*. 6th ed. 2012. p. 216–33.
47. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3685–91.
48. Baron F, Little M-T, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood Rev*. 2005;19(3):153–64.
49. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med*. 1988;108(6):806–14.
50. Fowler DH, Gress RE. Graft-vs.-Host Disease as a Th1-Type Process: Regulation by Th2-Type Cells. In: Ferrara JLM, Kennedy RC, Deeg HJ, editors. *Graft-Vs-Host Disease*. 3th ed. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 59–82.
51. Biron CA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):24–34.

52. Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(4):458–64.
53. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(12):945–56.
54. Greinix HT, Loddenkemper C, Pavletic SZ, Holler E, Socié G, Lawitschka A, et al. Diagnosis and staging of chronic graft-versus-host disease in the clinical practice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(2):167–75.
55. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, et al. Increasing Incidence of Chronic Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Transplantation: A Report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2015;21(2):266–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879114006600>
56. Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft-versus-host disease. *Blood Rev*. 2006;20(1):15–27.
57. Atkinson K. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1990;5(4):209–26.
58. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, et al. Chronic Graft-Versus-Host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*. 1980;69(2):204–17.
59. Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses*. 2014. p. 1049–72.
60. Lazarus HM, Vogelsang GB, Rowe JM. Prevention and treatment of acute graft-versus-host disease: the old and the new. A report from the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). *Bone Marrow Transplant*. 1997;19(6):577–600.
61. Cohen Y, Stern-Ginossar N. Manipulation of host pathways by human cytomegalovirus: insights from genome-wide studies. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2014;36(6):651–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-014-0443-7>
62. Marquardt A, Halle S, Seckert CK, Lemmermann NAW, Veres TZ, Braun A, et al. Single cell detection of latent cytomegalovirus reactivation in host tissue. *J Gen Virol*. 2011;92(6):1279–91.
63. Molldrem JJ, Shlomchik WD. Graft-vs.-Leukemia Effects. In: Ferrara JL., Cooke K., Deeg JH, editors. *Graft-Vs-Host Disease*. 3th ed. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 155–94.

64. Greer J, Foerster J, Lukens J., Rodgers G., Paraskevas F, Glader B. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11th: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. 884 p.
65. Körholz D, Kunst D, Hempel L, Söhngen D, Heyll A, Mauz-Körholz C, et al. Humoral immunodeficiency in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18(6):1123–30.
66. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, Black P, Castro-Malaspina H, Childs BH, et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood*. 1999;93(2):467–80.
67. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med*. 1995;332(3):143–9.
68. Roux E, Helg C, Dumont-Girard F, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood*. 1996;87(9):3984–92.
69. Ljungman P. Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21 Suppl 2:S72–4.
70. Barret J, Rezvani K, Salomon S. The Alloimmune response *Hematology*. American Society of Hematology Education Program Book Annual edition. San Diego, California: American Society of Hematology; 2003. p. 351–71.
71. Wils E-J, Cornelissen JJ. Thymopoiesis following allogeneic stem cell transplantation: new possibilities for improvement. *Blood Rev*. 2005;19(2):89–98.
72. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):289–95.
73. Lamb LS, Gee AP, Henslee-Downey PJ, Geier SS, Hazlett L, Pati AR, et al. Phenotypic and functional reconstitution of peripheral blood lymphocytes following T cell-depleted bone marrow transplantation from partially mismatched related donors. *Bone marrow transplantation*. 1998.
74. Pavletic ZS, Joshi SS, Pirruccello SJ, Tarantolo SR, Kollath J, Reed EC, et al. Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21(1):33–41.
75. Vossen MTM, Westerhout EM, Söderberg-Nauclér C, Wiertz EJHJ. Viral immune evasion: A masterpiece of evolution. *Immunogenetics*. 2002. p. 527–42.
76. Appay V, Van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry Part A*. 2008. p. 975–83.

77. Lowdell MW, Craston R, Ray N, Koh M, Galatowicz G, Prentice HG. The effect of T cell depletion with Campath-1M on immune reconstitution after chemotherapy and allogeneic bone marrow transplant as treatment for leukaemia. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21(7):679–86.
78. Maris M, Boeckh M, Storer B, Dawson M, White K, Keng M, et al. Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Exp Hematol*. 2003;31(10):941–52.
79. Mavroudis D, Barrett J. The graft-versus-leukemia effect. *Curr Opin Hematol*. 1996;3(6):423–9.
80. Hossain MS, Roback JD, Pollack BP, Jaye DL, Langston A, Waller EK. Chronic GvHD decreases antiviral immune responses in allogeneic BMT. *Blood*. 2007;109(10):4548–56.
81. Pawelec G. Immunosenescence: Role of cytomegalovirus. *Experimental Gerontology*. 2013;
82. Jang JE, Kim SJ, Cheong JW, Hyun SY, Kim YD, Kim YR, et al. Early CMV replication and subsequent chronic GVHD have a significant anti-leukemic effect after allogeneic HSCT in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2015;94(2):275–82.
83. Kamphorst AO, Ahmed R. CD4 T-cell immunotherapy for chronic viral infections and cancer. *Immunotherapy* [Internet]. 2013;5(9):975–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23998732>
84. Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, Doering TA, Odorizzi PM, Barnett BE, et al. Molecular and Transcriptional Basis of CD4+ T Cell Dysfunction during Chronic Infection. *Immunity*. 2014;40(2):289–302.
85. Rymkiewicz PD, Heng YX, Vasudev A, Larbi A. The immune system in the aging human. *Immunol Res*. 2012;53(1-3):235–50.
86. Van Baarle D, Tsegaye A, Miedema F, Akbar A. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: Rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunology Letters*. 2005. p. 19–29.
87. Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Zhou F, Williamson TS, Quinlan D, et al. Donor Serostatus Has an Impact on Cytomegalovirus-Specific Immunity, Cytomegaloviral Disease Incidence, and Survival in Seropositive Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(4):574–85.
88. Boussiotis VA, Chatterjee P, Li L. Biochemical Signaling of PD-1 on T Cells and Its Functional Implications. *Cancer J* [Internet]. 2014;20(4):265–71. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00130404-201407000-00006>

89. Dai S, Jia R, Zhang X, Fang Q, Huang L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cellular Immunology*. 2014. p. 72–9.
90. Parry R V, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi S V, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9543–53.
91. Kulpa DA, Lawani M, Cooper A, Peretz Y, Ahlers J, Sékaly RP. PD-1 coinhibitory signals: The link between pathogenesis and protection. *Seminars in Immunology*. 2013. p. 219–27.
92. Pedoeem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, Silverman GJ, Mor A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clinical Immunology*. 2014. p. 145–52.
93. Gallez-Hawkins GM, Thao L, Palmer J, Daxis A, Li X, Franck AE, et al. Increased programmed death-1 molecule expression in cytomegalovirus disease and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(7):872–80.
94. Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Matsuoka K-I, Fujii N, et al. Programmed Death-1 Pathway in Host Tissues Ameliorates Th17/Th1-Mediated Experimental Chronic Graft-versus-Host Disease. *J Immunol* [Internet]. 2014; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080485>
95. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*. 2013. p. 214–21.
96. Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*. 2015;(1096-0341 (Electronic)).
97. Thorp EB, Stehlik C, Ansari MJ. T-cell exhaustion in allograft rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(1):37–42.
98. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2010. p. 219–42.
99. Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunological Reviews*. 2009. p. 126–44.
100. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunological Reviews*. 2009. p. 5–11.
101. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*. 2002;185(3):273–82.

102. Riella L V., Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *American Journal of Transplantation*. 2012. p. 2575–87.
103. Kamphorst AO, Ahmed R. Manipulating the PD-1 pathway to improve immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2013. p. 381–8.
104. Blazar BR, Carreno BM, Panoskaltsis-Mortari A, Carter L, Iwai Y, Yagita H, et al. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003;171(3):1272–7.
105. Sandner SE, Clarkson MR, Salama AD, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Habicht A, et al. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J Immunol*. 2005;174(6):3408–15.

6. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

PREVIOUS CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT (HSCT) RECIPIENTS: A CAUSATIVE EFFECT IN DIFFERENTIAL PD-1 REGULATION ON CD4+ CELLS IN CHRONIC GVHD?

Claudia C Astigarraga^{1,3}, Laura Tabellini¹, Julia L. Richardt¹, Tara Bumgarner¹, Jeff Darlow¹, Steve Pergam¹, Maria Lucia Scroferneker⁴, Michael Boeckh^{1,2}, John Hansen^{1,2}

¹ Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle USA

² University of Washington, Seattle, USA

³ Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre Brazil

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre Brasil

Abstract

Cytomegalovirus infection (CMV) is known to have a lifelong effect on the distribution of T cell subsets, but little is known about the impact on cell function. We performed a global gene expression analysis in purified CD4⁺ T cells from 38 hematopoietic cell transplant (HCT) recipients (median age 48; range 20-65) studied on average. The study population included 18 patients with active chronic GVHD (cGVHD), and 20 tolerant (TOL) patients. Tolerance was defined by the absence of signs, symptoms of cGVHD and immunosuppressive therapy (IST) for at least 2 months. Gene expression was measured on Illumina bead arrays. CMV status was defined by pre-transplant recipient CMV serology (by ELISA). There was no recorded evidence of CMV reactivation at the time of study. Twelve candidate genes associated with immune function and inflammation were found to be associated to CMV positive serostatus in cGVHD patients at a significant threshold of $p < 0.05$ (PDCD-1; GZMH, IFNG, PRF1, CST7, IL18RAP, ITGAM, CTSW, ITGAL, GBP1, CDKN1B, CXCR4), but only three genes (CD14; CD86; IER3) were associated with CMV positive serostatus in TOL patients.

The significant higher PD-1 expression on CD4⁺ cells of CMV⁺, active cGVHD patients was confirmed by immunophenotype testing in an independent population.

CMV⁺/active cGVHD patients had a profile consistent with T effector cell activation that was not present in TOL and CMV⁻/active cGVHD patients.

Pursuing latency, cytomegalovirus will try to evade the immune system attempts of viral clearance creating modifications varying from changes in lymphocyte subsets to chromatin remodeling by several enzymes and microRNA. The chronic GVHD characteristic inflammatory environment, increased cytokine production, immunosuppressive therapy, and impaired T cell immune reconstitution may increase the risk of CMV reactivation, even clinically undetectable, followed by upregulation of genes related to T cell activation and effector function. The PD-1 gene can be upregulated in T cell activation and effector functions but it also has an essential role in preventing the expansion and function of effector cells, being a candidate target for the prevention or treatment of chronic GVHD. Understanding the CMV impact on the PD-1 regulation in active cGVHD would be the key for the implementation of new therapies, thus, more studies in larger populations are needed in order to understand CMV previous infection immunomodulation impact in T cell function during chronic GVHD.

Key words: CMV, cGVHD, PD-1, gene expression

Introduction

Human Cytomegalovirus (HCMV) is a β -Herpesvirus member of herpesviridae family and a widespread pathogen that infects the majority of world's population (40-100%) depending mostly on socioeconomic level and race. There are significant differences in the CMV seroepidemiology between and within countries (1–3).

HCMV does not usually causes clinically obvious disease upon primary infection in an immunocompetent individual but viral persistence is the rule following infection with all herpesvirus. HCMV can remain latent throughout the lifetime of the host and if sporadic reactivation events occur, they are well controlled by cell-mediated immune surveillance. However, as with primary infection, when reactivation occurs in immunocompromised AIDS patients or immunosuppressed hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and solid organ transplant patients, HCMV replication can become uncontrolled often leading to high levels of morbidity and mortality (4–7).

Before the preemptive anti-CMV treatment age, mortality due to CMV reactivation leading to disease could reach 90% of the post HSCT population (8–10).

Despite CMV disease is currently almost completely preventable, positive CMV serostatus of the recipient remains a poor prognostic factor, especially in recipients of T-cell depleted marrow or stem cells. An association of CMV with graft-versus-host-disease and nonviral infections or sepsis has been suggested as a possible mechanism.

It is known that CMV positive serostatus has impact in HSCT mortality. In recipients of unrelated grafts, there is a higher mortality risk for donor negative/recipient positive CMV serostatus, probably related to indirect immunomodulatory effects of CMV, since there is excessive mortality due to bacterial and fungal infections on this group of patients (11–15).

Cytomegalovirus infection and graft-versus-host-disease (GVHD) are important complications after HSCT and are pathogenically associated (10). It is well known that GVHD and its immunosuppressive treatment put patients at risk for CMV replication, but the role of CMV replication as a cause of GVHD is controversial, and data directly linking CMV replication and GVHD development are lacking, but there is the possibility that CMV can “pave the way” to GVHD (9,12,16–27).

Multiple studies show that GVHD and its treatment puts patient at risk of CMV replication

(17,28,29); in contrast, the role of CMV replication as a cause of GVHD is controversial. Opposite findings have been published on the effect of CMV in the development of acute GVHD (17,30–33). Regarding cGVHD, studies have shown increased risk of cGVHD with CMV viremia (23,34,35), and HSCT receiving pre-emptive therapy for CMV presented lower risk for severe cGVHD (36). Despite several previous studies, a recent large cohort study failed to associate CMV serostatus to increased risk of acute or chronic GVHD (37).

Comparing to our knowledge about acute GVHD, little is known about cGVHD pathophysiology but this disease remains the leading cause of non-relapse mortality in patients surviving more than 2 years post transplant, and its incidence is increasing progressively, being 37% at 1 year post transplant between the years of 2004 to 2007 (38).

Despite the morbidity and mortality related to CMV reactivation in HSCT, a recent study has found a protective effect of CMV reactivation on relapse in AML patients after allo-HSCT with myeloablative conditioning (20,39), showing that CMV reactivation does not have just a negative impact even on the HSCT setting. Other studies also showed that early CMV replication was considered an independent factor to reduce leukemic relapse risk in patients with pediatric acute leukemia or myelodysplastic syndromes (40), chronic myeloid leukemia (35) and adult acute myeloid leukemia (19,41). Jang et al. (42) showed that among 74 patients with acute myeloid leukemia, all CMV positive pre transplant, the ones with early CMV replication with low viral load and chronic GVHD had the best outcomes for leukemia free survival and overall survival in 5 years.

Although there has been extensive research in CMV reactivation impact on GVHD and vice versa, very little is known about the CMV infection as an agent in immunomodulation during cGVHD.

Often minor antigens are MHC-binding peptides, and thus viral peptide as well as MHC-binding peptides derived from polymorphic genetically determined proteins can be considered as minor antigens. There is speculation that GVHD reactivity in clinical situations might be directed, among others, against virus-infected host target cells, even in viremia absence.

An association between CMV and cGVHD is established in humans (23,42) and it was previously postulated that an immune response against CMV-infected host cells could have a role in chronic GVHD. Interestingly, some molecules as CD13, are shared by the CMV virion

and epithelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells and endothelial cells, common cellular targets for cGVHD (43).

In 2010, Van de Berg et al. (44) showed receptors in renal allograft that CMV induced a clear proinflammatory response characterized by increased levels of acute phase proteins such as serum amyloid-A and C-reactive protein, and type 1 cytokines such as IL-18, interferon inducible protein-10 and interferon- γ . This type of response was maintained during CMV latency, characterized by the absence of detectable CMV DNA in serum and presence of highly differentiated CMV specific cells that depend on antigen for survival, showing that CMV causes a local, low grade infection, possibly occurring in salivary glands and kidneys. Some of the CMV positive renal allograft receptors and healthy controls didn't show signs of immune reaction, showing that there are other factors involved. It is possible that something similar happens to chronic GVHD patients.

The pathway consisting of the programmed cell death 1 (PD-1) and its ligands PD-L1 and PD-L2 play a vital role in the induction and maintenance of peripheral tolerance. This pathway also regulates the balance between stimulatory and inhibitory signals needed for effective immunity and maintenance of T cell homeostasis. In contrast to this important beneficial role in maintaining T cell homeostasis, PD-1 mediates potent inhibitory signals that prevent the expression and function of T effector cells and have detrimental effect on antiviral and antitumor immunity.

PD-1 was initially identified as a molecule responsible by the induction of cell death, robustly expressed in activated mature cells, constitutively expressed in low levels in dendritic cells, macrophages and B cells and has further upregulation upon these cellular types activation, as well as it is also induced in activated T cells and natural killer T cells. PD-L1 is also induced in activated T cells and is expressed in a wide variety of non-hematopoietic cell types, including vascular endothelial cells, pancreatic islet cells, and sites of immune privilege including placenta, testes and eyes. In contrast, PD-L2 is induced primarily in DCs and macrophages. PD-1 reduces the threshold of TGF- β - mediated signals, thereby synergizing with TGF- β to promote conversion of naïve T cells into induced Tregs (iTregs). PD-1 can also alter the metabolic reprogramming of activated T cells and targets components of cell cycle machinery (45).

All the herpesvirus, including CMV, employ a plethora of mechanisms to circumvent clearance by host immune response, and a key feature is the employment of regulatory pathways that

limit immune responsiveness. Current data in mice suggest that MCMV actively manipulates PD-L1 to inhibit T cell activation (46).

Several recent reviews and clinical studies explore how the blockade of the PD-1 combined or not with other therapies as vaccination would be useful in controlling infections as HBV, HIV, HCV, cancer treatment, including hematological malignancies (47–54). Blocking the PD-1 signal would stop T effector cells suppression and increase the immune response to infected and cancer cells. But we have also learned that upon PD-1 blockade experimental conditions, the lack of T effector suppression can lead to worsening autoimmune diseases and increased alloresponse, culminating in graft rejection (35,45,52,54–59). Preservation of an intact PD-1 pathway might be important for the prevention of autoimmunity in patients undergoing reconstitution of their immune system after lymphoablation in solid organ and HSCT (55). Although PD-1 signaling blockade may enhance anti-tumor responses, this can be deleterious in bone marrow transplantation experimental conditions due to worsening GVHD (58,60). Even with this whole body of research, little is known about how PD-1 blocks T cell activation (45,50,52,56,61,62).

Patients

Thirty-eight patients were included in the gene expression study, with a time from transplant spanning from 11 to 64 months. Table 1 shows the population clinical characteristics at sample collection. Eighteen patients were seropositive at the time of transplant, nine of them had active symptoms of GVHD at the time of sample collection, and nine were considered clinically tolerants, with no signs of GVHD activity and without immunosuppressive therapy for at least 3 months before sample time. CMV serostatus was tested in patients and donors before transplant by serological method (ELISA).

An independent cohort of 36 patients had their freshly collected PBMC stained for PD1 expression on CD4 subsets, 18 were seronegative and 18 seropositive. All patients had cGVHD grade I-III and were on treatment.

Difference between CMV+ and CMV- was tested using t-test.

All subjects were enrolled with the approval of Fred Hutchinson Cancer Research Center institutional Review Board and signed informed consent on research protocol 1607.

Classification of GVHD

All patients had a comprehensive history and physical examination for GVHD assessment at the time blood samples were obtained for this study. The diagnosis of chronic GVHD was made according to the recommendations of the NIH Consensus Conference (62, 65). Immunological tolerance was defined as the absence of all reversible signs and symptoms of clinical GVHD in patients withdrawn from all immune suppression therapy for at least 2 months at the time of blood collection and with 1 year additional follow-up without recurrence of active GVHD.

The cohort included 19 patients with active GVHD (both classic and overlap syndrome: the patients had moderate to severe symptoms, 13 of them on immune suppression therapy and 6 were enrolled at diagnosis and had not started therapy yet. (Table 2)

Twenty patients were considered clinically tolerant and met the criteria described above.

CMV surveillance

CMV monitoring in blood was done for all patients at risk of CMV disease after transplant. CMV seropositive recipients of non-cord blood allogeneic transplants had CMV monitored in blood weekly until day 100 after transplant. CMV seronegative recipients were monitored weekly until day 60 after transplant. After day 100 post-transplant, CMV monitoring in blood continued, initially weekly, until 1 year after transplant for allogeneic recipients at risk of late CMV disease which included CMV-seropositive recipients receiving steroids for chronic GVHD and patients who were treated for CMV early after transplant .

In case of increased treatment with corticosteroid or additional systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD was added, weekly CMV monitoring was resumed.

Methods:

Peripheral blood CD4+ T cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by F-H centrifugation, washed in PBS and resuspended in FCS with 10% DMSO, and cryopreserved in liquid nitrogen. CD4+ T cells were purified from thawed PBMC collected from patients

treated at the Fred Hutchinson Cancer Research Center. We chose negative selection using magnetic beads (Miltenyi CD4 T cells isolation kit II) and resuspended the purified CD4 in TRIzol to stabilize RNA. An aliquot of purified CD4+ T cells was separated prior to adding TRIzol and stained with fluorochrome-labeled antihuman monoclonal antibodies CD4 FITC, CD3 PE, and CD8 PerC. Stained cells were analyzed on a BD FACScan using of BD CellQuest Pro software. The median purity of CD4+ T cells was 90% (range, 80-97%).

RNA extraction, amplification and hybridization. RNA was extracted from purified TRIzol-treated CD4+ T cells, and 200 ng of total RNA was used to generate cRNA with Illumina Total Prep RNA Amplification Kit (Ambion). Reverse transcription with the T7 oligo (dT) primer was used to produce the first strand cDNA. The cDNA then underwent second strand synthesis and RNA degradation by DNA polymerase and RNase H, followed by clean up. In vitro transcription (IVT) technology, along with biotin UTP, was employed to generate multiple copies of biotinylated cRNA; 0.75 µg of labeled cRNA was hybridized to an Illumina Human RefSeq8 BeadArray, and scanned on BeadArray Reader running the Beadscan software (www.illumina.com). Each Human RefSeq8 array slide accommodates 8 different samples.

ITN gene list. Because we were interested primarily in the immunological functions of CD4 T cells, we used a specific list of gene generated by the Immune Tolerance Network. The list includes known genes and expressed sequence tags (ESTs) suspected to be involved in immune regulation, including genes for cytokines/chemokines, cell surface receptors, apoptosis proteins, signal transduction molecules, transcription factors, heat shock proteins, extracellular proteins and nuclear receptors. Of the ~1,000 genes in the list, 653 were present on our dataset.

Data pre-processing, filtering and analysis. Illumina Human RefSeq8 expression array signal intensities were quantile normalized using the Bioconductor package lumi. The dataset was initially filtered by flagging probes that were below a signal “noise floor,” which was established using the 75th percentile of the negative control probe signals within each array, where at least 75% of the samples for a given probe had to be above threshold in order to be retained. We subsequently filtered the dataset by employing a variance filter using the “shorth” function of the Bioconductor package genefilter. Using the probes that passed

filtering, there were 653 associated with genes from the ITN list. Differential gene expression on the CMV serostatus (pos/neg) of 19 patients with active GVHD was performed on each of the 653 probes in R using a Mann-Whitney test, where 52 probes were found to have a p-value ≤ 0.05 . The Benjamini and Hochberg FDR method was used to correct for multiple testing correction, and significance was defined as $|\log_{2}FC| > 0.585$ and FDR 5%. Of the 52 genes of interest, 12 were found to be significantly differentially expressed.

Heatmap. Results of the analysis were introduced into MultiExperiment Viewer (MeV) software to perform hierarchical clustering. Clustering was made using Pearson distance correlation and average linkage.

PD1 phenotype analysis. Multi-channel cell surface staining was performed on freshly collected and isolated PBMC from an independent cohort of patients with various degrees of GVHD collected at 10-100 months post-transplant. PBMC were stained with the following fluorescent-conjugated anti-human monoclonal antibodies: PD1 PE-Cy7, CD4 APC-Cy7, CD45RA Alexa-Fluor, CD4 Pacific Blue, CD3 APC-Cy7, live-dead stain was applied to each test. Samples were acquired on a BD LSRII flow cytometer. All data were analyzed using Flow Jo software.

Results

Patients were stratified by GVHD activity: 18 patients with active cGVHD and 20 tolerant patients.

The 18 cGVHD and the 20 tolerant patients were divided by their pre-transplant CMV serostatus and CMV+ patients were compared to CMV- patients in each group.

Differentially expressed genes had to meet 2 conditions: $FDR > 5\%$ and $\log_{2}(FC) = 0.585$.

Differential gene expression in patients with active GVHD yielded 12 genes, 10 upregulated and 2 downregulated; while only 3 were different within the tolerants, suspected to be due to contamination by monocytes. (Table 3)

The genes differentially expressed in the CMV+/cGVHD+ group were effector molecules, IFNG-inducible genes and interestingly, there was upregulation of PD1.

The genes differentially expressed showed to differentiate between CMV+ and CMV- GVHD+ patients. (Figure 1)

PD-1 expression in mature and naïve CD4

PBMC from 36 patients with various degree of GVHD collected between 10 and 103 month post-transplant were stained for PD1 in CD4+ CD45RA- cells (Figure 2). The comparison between CMV+ and CMV- showed that while there was no difference in PD-1 expression in naïve T cells, (Figure 3A) there was a significant difference between CMV- and CMV+ in the mature compartment, with a mean expression of 25.5% (SEM 2.47) in the CMV- versus 36% (SEM 2.74) in the CMV+ group (χ -value=0.004) (Figure 3B).

Table 1: Pre-sample clinical characteristics

		active, moderate to severe GVHD	no active GVHD at least in the last 3 months
	TOTAL	Active OFF IST	Tolerants
Pre-samples clinical characteristics	38	18	20
Months from transplant	28 (11-64)	25 (11-64)	38 (12-60)
Age at transplant	44 (22-66)	55 (33-64)	39 (20-66)
HLA match (M/MM)	34/4	16/2	18/2
Donor type (MRD/URM)	20/18	11/7	9/11
FDNR	5	4	1
Conditioning (MA/NMA)	31/7	14/4	17/3
transplant source BM/PB	2/36	0/18	2/18
CMV serostatus patients (pos/neg)	18/20	9/9	9/11
CMV serostatus donor pos/neg)	15/23	6/12	9/11
CMV reactivation (yes/no)	13/25	7/11	6/13
aGVHD II-III (yes/no)	24/14	11/7	13/7
cGVHD onset (yes/no)	18/20	18/0	7/13
median month of cGVHD onset	8 (3-24)	9 (3-24)	7 (3-13)
CGVHD characteristics at sample collection			
Overlap	9	9	na
NIH chronic	12	12	na
IST yes/no	32/6	6-Dec	20/0
median month of cGVHD onset	8 (3-24)	9 (3-24)	7 (3-13)

Table 2: Chronic GVHD classification and treatment

	Active cGVHD=18	
	CMV positive=9	CMV negative=9
NIH classic chronic	5	7
Overlap syndrome	4	2
IST yes	2	6
IST no	5	1
Prednisone >30mg/day	1	0
Prednisone <30mg/day	2	4

Table 3: Gene log FC values

Active GVHD		Tolerants	
Gene symbol	logFC	Gene symbol	logFC
GZMH	2.20	CD14	-0.75
IFNG	1.36	CD68	-1.02
PRF1	1.32	IER3	-1.19
CST7	1.05		
IL18RAP	1.04		
ITGAM	0.94		
CTSW	0.74		
ITGAL	0.68		
PDCD1	0.67		
GBP1	0.60		
CDKN1B	-0.63		
CXCR4	-0.80		

GZMH= Granzyme H; IFNG=interferon gamma; PRF1=perforin 1; CST7=leukocystatin; IL18RAP=interleukin 18 receptor accessory protein; ITGAM=alpha M integrin; CTSW=cathepsin W; ITGAL=lymphocyte function- associated antigen 1; PDCD-1=programmed cell death 1; GBP1=interferon-inducible guanylate binding protein 1; CDKN1B=cyclin-dependent kinase inhibitor 1B;CXCR4=chemokine receptor 4; IER3=immediate early response 3 interactive protein 1.

Figure 2: Gating strategy for PD1+ in mature and naïve CD4; after gating on live PBMC, CD45RA was used to distinguish CD3+/CD4+/CD45RA+ (naïve CD4 T cells) and CD45RA- (mature CD4 T cells); PD-1+ cells were gated on both CD45RA+ and CD45RA- T cells.

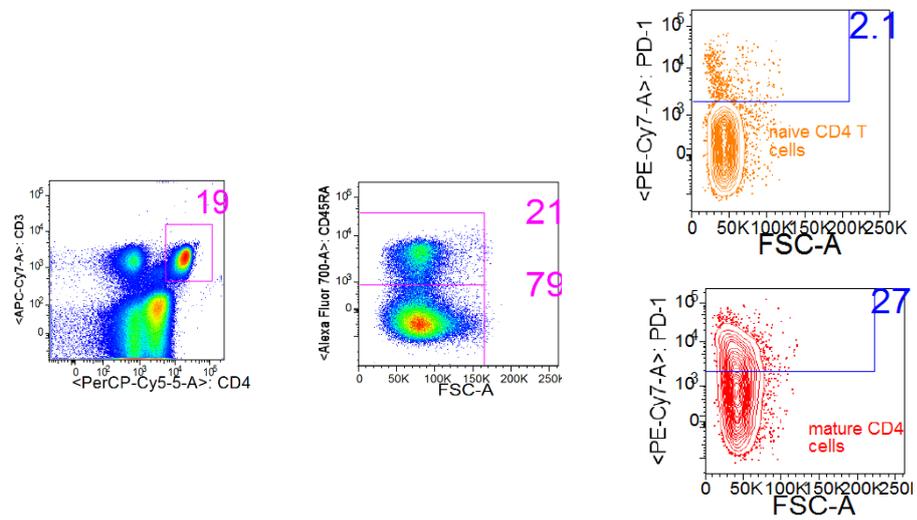
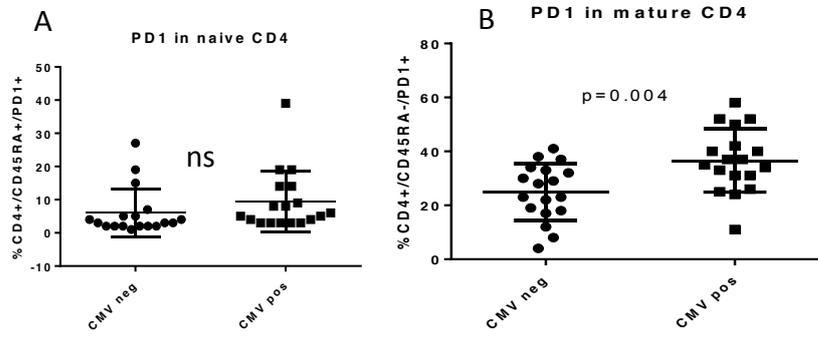


Figure 3: PD-1 expression on naive and mature CD4 in 18 patients with GVHD.



Discussion

We studied possible CD4⁺ T cells gene expression differences in tolerant and active chronic GVHD patients post HSCT, taking into account the history of CMV infection previous to the transplant and its potential immunomodulatory effect post transplant in patients with no detectable CMV viremia at the evaluation time.

We did not identify significant gene expression differences between CMV⁺ and CMV⁻ patients in the tolerant group, probably due to acquired immune homeostasis secondary to superior immune reconstitution and a non-inflammatory environment. The differently expressed genes were probably present, due to small monocyte contamination on the CD4 population (CD14, CD68).

However, the active chronic GVHD group analysis showed a different picture. Patients CMV⁺ showed significantly different expression of genes involved in T cell activation with effector molecules, interferon γ and interferon inducible molecules, configuring a Th-1 profile, but also a significantly different PD-1 upregulation. The PD-1/PD-Ls pathway is known by its critical role in regulating T cell response and maintaining peripheral tolerance.

To confirm the PD-1 data, we performed an immunophenotyping study in an independent group of patients with active cGVHD and again, the PD-1 expression in mature CD4⁺ was significantly higher in CMV⁺ patients compared to the CMV⁻ ones ($p=0.004$).

Chronic graft-versus-host disease (GVHD) is an immunoregulatory disorder and often shares features of autoimmunity and immunodeficiency. While the pathophysiology of acute GVHD, which begins with tissue injury and up-regulation of inflammatory cytokines in concert with T-cell alloreactivity, is relatively well understood, the pathophysiology of chronic GVHD is not well defined. Acute graft-versus-host disease is considered a Th1 disease and initially chronic graft-versus-host disease was considered to be a Th-2-mediated disease, but didn't fit neatly into the Th-2 paradigm. Recent studies suggested that cGVHD may be caused by several different mechanisms: cytokines secreted by Th-1 cells, Th17 cells, autoantibodies (63).

CMV reactivation and previous diagnostic of acute GVHD grade II-II were similar between the CMV positive and negative groups among the cGVHD, so our findings were not related to higher frequency of CMV reactivation or acute GVHD in the cGVHD/CMV⁺ group.

Our cGVHD group had active GVHD varying from grade II to III, and included patients diagnosed with chronic classic GVHD and overlap syndrome having a myriad of different

clinical aspects involving different targeted organs and diverse inflammatory environments, so the Th-1 related genes up-regulation can be expected in this context. But what would be the potential CMV role in this type of immune response? Intracellular viruses induce Th-1 responses and stimulate antigen-presenting cells to produce IL-12, which promotes the differentiation of naïve CD4+ and CD8+ cells into interferon γ -secreting effector cells (64). One could argue our findings were related to the CMV presence and not to cGVHD, but we couldn't observe T cell activation genes among the tolerant group in CMV positive patients, showing that at least in this group of patients the previous CMV infection, by itself, is not causing apparent immunomodulation. Regarding the active cGVHD group, the CMV+/cGVHD active group had twelve genes significantly differentially expressed using a very strict significance definition, which we found to be a better approach on this discovery study in a small group of patients. Even in the presence of an inflammatory environment due to cGVHD, genes involved in the Th-1 immune response were significantly less expressed in CMV negative patients.

The GVHD classification, according to NIH and immunosuppressive therapy in the cGVHD group, is shown in table 3. The active chronic GVHD/CMV+ group had more NIH classic chronic patients and less overlap syndrome than the CGVHD/CMV-, but even presenting more patients without immunosuppressive therapy, we cannot say they were less immunosuppressed, since on this group we have patients with sample collected at cGVHD diagnosis, immediately before starting therapy, with enough inflammatory response to have therapy implemented.

We assumed our patients were in operational latency due to lack of detectable viremia at the time of sample collection. Medical charts were reviewed and according to medical evaluation no signs or symptoms of CMV disease were present on this group of patients, and CMV PCR collected at the sample time was negative.

We didn't have additional samples to retest CMV PCR at the experiment moment or available biopsy tissues from the cGVHD targeted organs, which immunohistochemical evaluation would help us define chronic infection and viral shedding from cGVHD tissues.

In our study even with PD-1 being differentially expressed between CMV+ and CMV- among the cGVHD group, we didn't call these specific cells in an exhaustion state, since we don't think phenotype studies are sufficient to correctly identify this cell state. Cell exhaustion may be a layered or progressive process into which T cells falls upon repeated reactivation, acquiring multiple inhibitory surface molecules in persistent disease settings such as chronic infections

and malignancies preventing T cell activation, and PD-1 was proposed to be a marker of cell exhaustion (65), but this marker is not exclusively expressed on this type of cell. Activated, memory and exhausted cells can share molecules, including PD-1, which will be less or more expressed according to the immune response moment. So cell metabolism studies are more appropriate than phenotyping to correctly classify the exhaustion status (15,66).

This is the first study in humans, possibly linking PD-1 up-regulation and expression to a possible immunomodulatory effect of CMV previous infection in cGVHD.

In a previous study, a cohort of patients was prospectively studied for CMV infection and immunity and then retrospectively tested for PD-1 expression and suggested that PD-1 is induced by acute GVHD even in the absence of CMV viremia, being this finding not observed among chronic GVHD patients (53).

In this study, patients were studied primarily regarding CMV disease, delayed CMV viral clearance and absence of viremia until 1 year post transplant, whereas our study was performed several years post transplant, but mostly, the cGVHD classification was performed differently (we used the NIH classification) and just 31 in 206 patients, had limited or extensive cGVHD and among this group only 3 patients were CMV negative previous to the transplant, being not possible a direct comparison between CMV negative and positive patients among the cGVHD group.

In mice, PD-1 expression was continuously upregulated in chronic GVHD development in donor T cells, whereas PD-L1 expression in host tissues was transiently up-regulated and declined to basal levels in the late posttransplant period.

Blockade of the PD-1 pathway exacerbated clinical and pathologic chronic GVHD and stimulation of the PD-1 pathway alleviated chronic GVHD (67).

One of the study strengths is the fact we used equivalent numbers of patients CMV positive and negative in the tolerant versus active cGVHD analysis. We could systematically compare the absence of cGVHD and the absence of CMV previous to the transplant among the groups. Perhaps our strict significance definition in the global gene expression analysis had decreased the list of differentially expressed genes between the active cGVHD groups, due to false-negatives, but the twelve genes differently expressed already points to an incontestable activation profile, which can also explain the PD-1 up-regulation and increased expression in our independent validation cohort, but our experiment wasn't able to address if these cells are in exhausted state.

It is tempting to conjecture if previous CMV infection, even on viremia absence, is able to immunomodulate the immune response and up-regulate PD-1 in cells and PD ligands on peripheral tissues, where cells can be led to activation and exhaustion decreasing the ability to control viral replication. These same CMV viral peptides, which started an immune response, could be continuously presented as minor antigens by the MHC or not, and in concert with the cytokine presence and deficient immune reconstitution, characteristic to cGVHD, perpetuate the alloresponse and also upregulate PD-1, leading to further cell activation followed by exhaustion which, at the end, would protect from the damage caused by cell activation during cGVHD, through several mechanisms, being induction of Tregs one of them. The CMV immunomodulation would prone cells and environment to perpetuate the cGVHD and vice-versa. Our knowledge about the cGVHD pathophysiology is limited, but certainly it is a complex process with multiple layers, and previous CMV infection has the potential to be involved, but not directly cause the cGVHD, since we have CMV+ that do not develop cGVHD.

The balance between cell activation and exhaustion, orchestrated by PD-1 and its ligands and regulated by the fine and delicate interaction between CMV immunomodulation and cGVHD could theoretically explain the significant anti-leukemic effect in AML patients after HSCT followed by early CMV replication and subsequent chronic GVHD found in previous studies (42).

In summary, we evaluated a population of patients who received HSCT several years ago and it was found a significantly different gene expression of T cell activation genes in a Th-1 fashion and also PD-1 in an active cGVHD group of patients, when comparing previous to the transplant CMV serostatus without signs of viremia.

cGVHD is a high mortality disease and needs new therapeutical modalities. CMV infection is a constant menace for patients submitted to HSCT and still, to this day, can lead to death. A better understanding of the potential link between CMV infection and cGVHD and its possible impact on PD-1 regulation would be of utmost importance in the future, where, maybe, we will be able to enhance the PD-1 signaling pathway and improve clinical cGVHD but still keeping the CMV infection under control and preserving the GVL effect.

References

1. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “Silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):86–102.
2. Goodrum F, Caviness K, Zagallo P. Human cytomegalovirus persistence. *Cellular Microbiology.* 2012. p. 644–55.
3. Slobedman B, Stern JL, Cunningham AL, Abendroth A, Abate DA, Mocarski ES. Impact of human cytomegalovirus latent infection on myeloid progenitor cell gene expression. *J Virol.* 2004;78(8):4054–62.
4. Poole E, Wills M, Sinclair J. Human Cytomegalovirus Latency: Targeting Differences in the Latently Infected Cell with a View to Clearing Latent Infection. *New J Sci [Internet].* 2014;2014:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/njos/2014/313761/>
5. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology.* 2006. p. 1763–79.
6. Sinclair J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol.* 2008;41(3):180–5.
7. Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2008. p. 297–313.
8. Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res.* 2011;157(2):175–9.
9. Palaniyandi S, Radhakrishnan SV, Karlsson FJ, Stokes KY, Kittan N, Huber E, et al. Murine Cytomegalovirus Immediate-Early 1 Gene Expression Correlates with Increased GVHD after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Recipients Reactivating from Latent Infection. *PLoS One.* 2013;8(4).
10. Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae.* 2011;2(1):6.
11. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis.* 2002;185(3):273–82.
12. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2003. p. 543–58.

13. Dalgleish AG, O'Byrne KJ. Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer. *Advances in Cancer Research*. 2002. p. 231–76.
14. Yao ZQ, Moorman JP. Immune exhaustion and immune senescence: Two distinct pathways for HBV vaccine failure during HCV and/or HIV infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2013. p. 193–201.
15. Schurich A, Henson SM. The Many Unknowns Concerning the Bioenergetics of Exhaustion and Senescence during Chronic Viral Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2014;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00468/abstract>
16. Peggs KS, Mackinnon S. Cytomegalovirus: The role of CMV post-haematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004. p. 695–701.
17. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(9):1309–14.
18. Kansu E. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2004;79(3):209–15.
19. Elmaagacli AH, Steckel NK, Koldehoff M, Hegerfeldt Y, Trensche R, Ditschkowski M, et al. Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: Evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2011;118(5):1402–12.
20. Manjappa S, Bhamidipati PK, Stokerl-Goldstein KE, DiPersio JF, Uy GL, Westervelt P, et al. Protective effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia patients is influenced by conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2014;20(1):46–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120526>
21. Boeckh M, Murphy WJ, Peggs KS. Recent Advances in Cytomegalovirus: An Update on Pharmacologic and Cellular Therapies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;
22. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akbar A, Arens R, Chiu YL, et al. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2014;55:54–62.
23. Lönnqvist B, Ringdén O, Wahren B, Gahrton G, Lundgren G. Cytomegalovirus infection associated with and preceding chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1984;38(5):465–8.
24. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Effros R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Is immunosenescence infectious? *Trends in Immunology*. 2004. p. 406–10.

25. Pawelec G. Immunosenescence: Role of cytomegalovirus. *Experimental Gerontology*. 2013;
26. Wertheimer AM, Bennett MS, Park B, Uhrlaub JL, Martinez C, Pulko V, et al. Aging and cytomegalovirus infection differentially and jointly affect distinct circulating T cell subsets in humans. *J Immunol* [Internet]. 2014;192(5):2143–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24501199>
27. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck-Loebenstien B, et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest*. 2009;119(10):3070–8.
28. Miller-Kittrell M, Sparer TE. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virology*. 2009;6:4.
29. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006;91(1):78–83.
30. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: An EBMT megafile analysis. *Blood*. 2003;102(13):4255–60.
31. Matthes-Martin S, Aberle SW, Peters C, Holter W, Popow-Kraupp T, Pötschger U, et al. CMV-viraemia during allogeneic bone marrow transplantation in paediatric patients: association with survival and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21 Suppl 2:S53–6.
32. Wang L-R, Dong L-J, Zhang M-J, Lu D-P. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(10):673–7.
33. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, et al. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*. 2000;95(7):2240–5.
34. Soderberg C, Larsson S, Rozell BL, Sumitran-Karuppan S, Ljungman P, Moller E. Cytomegalovirus-induced CD13-specific autoimmunity—a possible cause of chronic graft-vs-host disease. *Transplantation*. 1996;61(4):600–9.
35. Ito S, Pophali P, Co W, Koklanaris EK, Superata J, Fahle G a, et al. CMV reactivation is associated with a lower incidence of relapse after allo-SCT for CML. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2013;48(10):1313–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562969>
36. Larsson K, Aschan J, Remberger M, Ringdén O, Winiarski J, Ljungman P. Reduced risk for extensive chronic graft-versus-host disease in patients receiving transplants with

- human leukocyte antigen-identical sibling donors given polymerase chain reaction-based preemptive therapy against cytomegalovirus. *Transplantation*. 2004;77(4):526–31.
37. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011;117(11):3214–9.
 38. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, et al. Increasing Incidence of Chronic Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Transplantation: A Report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2015;21(2):266–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879114006600>
 39. Elmaagacli AH. CMV and Relapse: What Has Conditioning to Do with It? *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20(1):1–2.
 40. Behrendt CE, Rosenthal J, Bolotin E, Nakamura R, Zaia J, Forman SJ. Donor and Recipient CMV Serostatus and Outcome of Pediatric Allogeneic HSCT for Acute Leukemia in the Era of CMV-Preemptive Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(1):54–60.
 41. Green ML, Leisenring WM, Xie H, Walter RB, Mielcarek M, Sandmaier BM, et al. CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(7):1316–24.
 42. Jang JE, Kim SJ, Cheong JW, Hyun SY, Kim YD, Kim YR, et al. Early CMV replication and subsequent chronic GVHD have a significant anti-leukemic effect after allogeneic HSCT in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2015;94(2):275–82.
 43. Nauclicr CS, Larsson S, Moller E. A novel mechanism for virus-induced autoimmunity in humans. *Immunol Rev*. 1996;152:175–92.
 44. Van de Berg PJ, Heutinck KM, Raabe R, Minnee RC, Young S La, van Donselaar-van der Pant KA, et al. Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. *J Infect Dis*. 2010;202(5):690–9.
 45. Boussiotis VA, Chatterjee P, Li L. Biochemical Signaling of PD-1 on T Cells and Its Functional Implications. *Cancer J* [Internet]. 2014;20(4):265–71. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00130404-201407000-00006>
 46. Stack G, Stacey MA, Humphreys IR. Herpesvirus exploitation of host immune inhibitory pathways. *Viruses*. 2012. p. 1182–201.
 47. Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*. 2015;(1096-0341 (Electronic)).

48. Hofmeyer KA, Jeon H, Zang X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011.
49. Kaufmann DE, Walker BD. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol*. 2009;182(10):5891–7.
50. Kulpa DA, Lawani M, Cooper A, Peretz Y, Ahlers J, Sékaly RP. PD-1 coinhibitory signals: The link between pathogenesis and protection. *Seminars in Immunology*. 2013. p. 219–27.
51. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y, et al. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 2009;23(2):375–82.
52. Pedoeem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, Silverman GJ, Mor A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clinical Immunology*. 2014. p. 145–52.
53. Gallez-Hawkins GM, Thao L, Palmer J, Daxis A, Li X, Franck AE, et al. Increased programmed death-1 molecule expression in cytomegalovirus disease and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(7):872–80.
54. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2010. p. 219–42.
55. Riella L V., Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *American Journal of Transplantation*. 2012. p. 2575–87.
56. Dai S, Jia R, Zhang X, Fang Q, Huang L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cellular Immunology*. 2014. p. 72–9.
57. Sandner SE, Clarkson MR, Salama AD, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Habicht A, et al. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J Immunol*. 2005;174(6):3408–15.
58. Blazar BR, Carreno BM, Panoskaltsis-Mortari A, Carter L, Iwai Y, Yagita H, et al. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003;171(3):1272–7.
59. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Köhler H, Sester M. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus-specific t cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant*. 2008;8(7):1486–97.
60. Saha A, Aoyama K, Taylor PA, Koehn BH, Veenstra RG, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Host programmed death ligand 1 is dominant over programmed death ligand 2

expression in regulating graft-versus-host disease lethality. *Blood* [Internet]. 2013;122(17):3062–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24030385>

61. Parry R V, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi S V, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9543–53.
62. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(12):945–56.
63. Nishimori H, Maeda Y, Tanimoto M. Chronic graft-versus-host disease: Disease biology and novel therapeutic strategies. *Acta Medica Okayama*. 2013. p. 1–8.
64. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):984–93.
65. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682–7.
66. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*. 2013. p. 214–21.
67. Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Matsuoka K-I, Fujii N, et al. Programmed Death-1 Pathway in Host Tissues Ameliorates Th17/Th1-Mediated Experimental Chronic Graft-versus-Host Disease. *J Immunol* [Internet]. 2014; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080485>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi estudada uma população pequena de pacientes vários anos após transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas. Foi encontrada diferença significativa na expressão gênica de células CD4+ em pacientes com GVHD crônico ativo, comparando pacientes expostos ou não, a infecção prévia ao transplante por CMV. As células CD4+ de pacientes CMV+ sem sinais de viremia pelo vírus e com GVHD crônico mostraram um perfil gênico compatível com ativação celular Th-1 e também gene PD-1 de morte celular suprarregulado.

É tentador conjecturar se infecção prévia por CMV, mesmo na ausência de viremia, é capaz de imunomodular a resposta imune e suprarregular PD-1 e seus ligantes em tecidos periféricos, onde linfócitos podem ser levados à ativação e posterior exaustão, diminuindo, assim, a habilidade de controlar a replicação viral. Estes mesmos peptídeos virais, que iniciaram a resposta imune, poderiam ser continuamente apresentados como antígenos menores de histocompatibilidade, ligados ou não ao MHC e, em conjunto com a presença de citocinas, e reconstituição imune deficiente, características do cGVHD, perpetuariam a resposta aloimune e também suprarregulariam PD-1, levando a mais ativação linfocitária seguida de exaustão celular, o que, no final, protegeria as células do dano causado pelo cGVHD, de diversas formas, entre elas, a indução de células T reguladoras (Tregs).

A imunomodulação pelo CMV deixaria as células e o ambiente suscetíveis a perpetuar o cGVHD e vice versa.

O nosso conhecimento sobre a fisiopatogenia do cGVHD é limitada, mas este, certamente é um processo complexo e com múltiplas camadas e a infecção prévia por CMV tem o potencial de estar envolvido na patofisiologia do cGVHD, mas não diretamente causá-lo, já que sabemos que vários pacientes com CMV positivo prévio ao transplante não desenvolvem cGVHD.

O equilíbrio entre ativação e exaustão, orquestrado pela via do PD-1 e seus ligantes é regulado pela delicada interação entre imunomodulação causada pelo CMV e cGVHD, poderia explicar o novo modo como estamos começando a olhar a infecção por CMV, visto os estudos prévios demonstrarem um efeito anti-leucemia da replicação precoce de CMV seguido por cGVHD.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A doença do enxerto-contra-o-hospedeiro crônica (cGVHD) traz alta mortalidade aos pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, necessitando novas modalidades de terapia. A infecção por CMV é uma ameaça constante para pacientes pós-transplante e, até hoje, causa mortalidade. O melhor entendimento da ligação potencial entre infecção por CMV e cGVHD e seu possível impacto na regulação de PD-1 seria de extrema importância no futuro, onde, talvez, sejamos capazes de incrementar a via de sinalização do PD-1 e melhorar clinicamente o cGVHD, mas ainda mantendo a infecção por CMV controlada e preservando também o efeito GVL.

9. ANEXOS

Observação: os protocolos 1607 e 2192 ainda estão em andamento no Fred Hutchinson Cancer Research Center e são considerados material confidencial, por isto não foi possível incluí-los como anexos nesta sessão.