Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

ANA CAROLINA TERRA MERCADANTE

Efeito protetor da terapia combinada de indução de tolerância oral e tratamento probiótico do doador na Doença Enxerto contra Hospedeiro aguda

Orientador: Prof. Dra. Adriana Bonomo

RIO DE JANEIRO
2013

Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

ANA CAROLINA TERRA MERCADANTE

Efeito protetor da terapia combinada de indução de tolerância oral e tratamento probiótico do doador na Doença Enxerto contra Hospedeiro aguda

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia.

Orientador: Prof. Dra. Adriana Bonomo

RIO DE JANEIRO
2013

M553e Mercadante, Ana Carolina Terra.
Efeito protetor da terapia combinada de indução de tolerância oral e tratamento probiótico do doador na Doença Enxerto contra Hospedeiro aguda./ Ana Carolina Terra Mercadante. – Rio de Janeiro: INCA, 2013.
153 fl.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia) - Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Oncologia. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva 2013.

Orientador (a): Adriana Cesar Bonomo.

1. Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas. 2. Doença Enxerto-Hospedeiro . 3. Tolerância de Enxerto. 4. Probiótico-Tratamento. I. Bonomo, Adriana César (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. II. Título.

CDD 6161.99441

Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

ANA CAROLINA TERRA MERCADANTE

EFEITO PROTETOR DA TERAPIA COMBINADA DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL E TRATAMENTO PROBIÓTICO DO DOADOR NA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA

ORIENTADOR: PROF. DRa. ADRIANA BONOMO

Aprovada em: 15/05/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Claudia E. A. Rocio Hassan (INCA) **– Presidente**.
Prof. Dr. Martin H. Bonamino (INCA).
Prof. Dra. Verônica P.C. de Vasconcellos Coelho (USP).
Prof. Dra. Rita Vasconcellos (UFF).
Prof. Dra. Ilana Zalcberg Renault (INCA) – Suplente I.
Prof. Dr. Vinicius Almeida (FIOCRUZ) – Suplente II

RIO DE JANEIRO
2013

EFEITO PROTETOR DA TERAPIA COMBINADA DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL E TRATAMENTO PROBIÓTICO DO DOADOR NA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Ana Carolina Terra Mercadante

A maior limitação do transplante de células-tronco hematopoiético alogeneico (TCTHa) é a doença enxerto contra hospedeiro (DECH), uma resposta mediada por células T, que está intimamente associada ao efeito benéfico enxerto contra leucemia (ECL). As terapias utilizadas no tratamento da DECH são comumente baseadas na administração de imunossupressores não-específicos, resultando e inúmeras complicações clínicas e inibição do efeito ECL nos pacientes transplantados. Neste trabalho propomos uma abordagem alternativa baseada na indução de tolerância oral com proteínas do receptor em doadores de um transplante semialogeneico, associado à ingestão da bactéria probiótica *Lactococcus lactis*, utilizada aqui como um adjuvante da tolerância (terapia combinada). O tratamento dos doadores com a terapia combinada previamente ao transplante protegeu os receptores das manifestações clínicas e patológicas da doença, resultando em 100% de sobrevida e ainda foi capaz de manter o efeito enxerto contra leucemia. A proteção é específica, duradoura e dependente da atividade de células B IL-10 suficientes, as quais são capazes de induzir células Treg no receptor. Esses dados sugerem que a terapia combinada representa uma estratégia promissora na prevenção da DECH, mas com a preservação da ECL, abrindo novas possibilidades para o tratamento de pacientes humanos que serão submetidos ao TCTHa.

EFEITO PROTETOR DA TERAPIA COMBINADA DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL E TRATAMENTO PROBIÓTICO DO DOADOR NA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Ana Carolina Terra Mercadante

The major limitation of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT) is graft-versus-host disease (GVHD), a T cell-mediated response that is closely related to the benefic graft versus leukemia reaction (GVLr). Therapy for GVHD is commonly based on non-specific immunosupression of the transplant recipient, resulting in several clinical complications and inhibition of GVLr. Here we propose an alternative approach based on induction of oral tolerance to the recipient antigens in a semiallogenic transplant donors, associated with intake of probiotic *Lactococcus lactis* as tolerogenic adjuvant (combined therapy). We show that treatment of donor mice with combined therapy before the transplant protects the recipients from clinical and pathological manifestations of disease, resulting in 100% survival rates and maintenance of GVLr. The protection is specific, long lasting and dependent on donor B IL-10 sufficient cells activity, which induces regulatory T cells in the host. These data suggest that combined therapy is a promising strategy for prevention of GVHD with preservation of GVL, opening new possibilities to treat human patients subjected to allogeneic aHSCT.

Aos meus pais, Cecilia e Claudio,
por sua fé inabalável em mim...

Agradecimentos...

Essa tese não seria possível sem que pessoas muito especiais estivessem ao meu lado, então para cada uma delas, o meu mais sincero "obrigada"! Obrigada...

A todos que fizeram parte da MEDEX, Departamento de Medicina Experimental, lugar onde encontrei colegas maravilhosos com quem trabalhar e encontrei amigos para a vida... Ana Paula, sinceramente? Não tenho palavras para te agradecer... você me ajudou desde o primeiro dia, foi minha grande companheira na jornada do aperfeiçoamento, durante a fase das timectomias e, enfim, doença enxerto., foi minha conselheira e foi minha ajudante, mas, acima de tudo, minha amiga... só dizer obrigada a você, parece pouco... . Ao João Paulo, por todos os ensinamentos! Ao Rômulo Areal, porque até nas brigas nos divertíamos! Ao Galvani, pela amizade divertida e pelos salvamentos de última hora com micrografias de cores engraçadas e dados estatísticos desencontrados. À Ana Carolina Monteiro, pela amizade e longas conversas!

Quando já não esperava, ganhei um presente da vida... Su (Suelen Perobelli), sabe aquele tipo de amiga com quem você ri, chora, briga, faz as pazes, desabafa, ri mais um pouco e ainda divide os experimentos megalomaníacos? Essa é a Su...Obrigada, amiga, por tudo! Obrigada também à Triciana por toda ajuda no fim da tese! Como não agradecer ao Wallace? Figura, obrigada por toda ajuda também!

A todos os demais grupos que completavam a MEDEX. Obrigada ao Dr. Marcello Barcinski, Martin Bonamino e Etel Gimba e a seus respectivos grupos pela amizade e suporte científico ao longo desses anos!

Aos técnicos, secretárias e pessoal do apoio, em especial à Andrea e a D. Rose, pela amizade, conselhos e ombro amigo quando precisei! Tudo regado ao cafezinho necessário de todas as tardes!

A todos da Pesquisa Clínica, principalmente à Cinthya Sternberg, Viviane Alves e Haynna Innada que abriram suas portas para nós Bonomianos e nos receberam de braços abertos... um obrigada mais que especial!! E também a todos do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, em especial ao Dr. Wilson Savino, que nos incorporou em seu laboratório como se fossemos desde sempre um grupo só!

Finalmente, agradeço a grande responsável por eu ter feito parte de um grupo tão maravilhoso... à minha orientadora, Adriana Bonomo! Adriana, há 5 anos fui procurar uma

pesquisadora cujo trabalho eu sempre admirei e de cara me tornei fã também pessoa "Adriana". Como orientadora, descobri que você tem um jeito todo seu de falar da ciência que nos instiga a querer saber sempre mais. Você não nos mostra simplesmente a resposta, mas nos ensina a fazer as perguntas certas para chegarmos a elas. E se hoje sou uma pessoa muito mais madura cientificamente e posso ganhar um título de doutora, devo a você! Obrigada por acreditar em mim e espero ter retribuído essa confiança!

Essa tese não existiria sem que contribuições externas nos dessem as ferramentas necessárias. Assim, gostaria de agradecer imensamente à Dra. Ana Maria Caetano, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a seus alunos, em especial a Ana Cristina Gomes-Santos, pela ajuda com parte de tolerância oral (do conceito à prática!), com os probióticos e por me receber sempre que eu precisava rever meus conceitos e técnicas! Ao Dr. Anderson Miyoshi, também da UFMG, pela doação das bactérias.

E, é claro que existe vida fora do laboratório (!). Assim, toda vez que saia de lá, pessoas essenciais me esperavam de braços abertos... à elas, muito obrigada...

Aos meus pais, meus primeiros mestres, por me ensinarem a sonhar e a lutar por meus sonhos, mesmo que eles estivessem tão longe da minha realidade; por me ensinarem a calcar meus caminhos em bases concretas de dignidade e respeito ao próximo e a mim mesma. Obrigada pelas oportunidades que me proporcionaram, e continuam proporcionando, mas acima de tudo, obrigada por me fazer ter orgulho da pessoa que me tornei. Amo vocês!

Ao Thiago por todo amor, carinho e apoio! Obrigada por me fazer sentir especial e por ter colorido ainda mais os meus dias! Com você ao meu lado sei que posso ir mais longe. Te amo muito!

A toda a minha família, em especial meus padrinhos e meus avós, e à todos os meus primos e amigos, principalmente à Gabriela (Bibi) e Mariana... obrigada por não desistirem de mim mesmo quando minhas ausências foram mais frequentes do que eu gostaria e por estarem sempre esperando pela minha volta. Amo muito vocês!!!

Por fim, e mais importante, obrigada a Aquele que é a causa primária de todas as coisas....

"Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança que confronta os fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada."

Marie Sklodowska-Curie

Índice:

1.INTRODUÇÃO.....1

1.1. Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas (TCTH).....**1**

1.1.1. Regime de Condicionamento.....**2**

1.1.2. Fontes de células-tronco hematopoiéticas.....**3**

1.1.3. Doadores de células-tronco hematopoiéticas.....**6**

1.2. Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH).....**8**

1.2.1. Aspectos Clínicos da DECH.....**10**

1.2.2.A Imunobiologia da DECH.....**13**

1.2.3. Profilaxia e tratamento da DECH.....**18**

1.2.4.A Doença Enxerto Contra Hospedeiro X Efeito Enxerto Contra Leucemia.....**19**

1.3.O Intestino.....**22**

1.3.1.A microbiota intestinal.....**25**

1.3.2. Mucosa intestinal e sua constante "paz armada".....**27**

1.3.3. Tolerância Oral.....**36**

1.3.4. Probióticos.....**42**

1.4. Doença enxerto contra hospedeiro, tolerância oral e probióticos: juntando as peças.....**50**

2.OBJETIVOS.....53

2.1. Objetivo Principal.....**53**

2.1. Objetivos específicos.....**53**

3.MATERIAIS E MÉTODOS.....54

3.1. Animais.....**54**

3.2. Cultivo do *Lactococcus lactis ssp lactis***.....54**

3.3. Extrato de proteínas do receptor.....**54**

3.4. Tratamento do doador com a Terapia Combinada.....**55**

3.5. Transplante de medula óssea (TMO).....**56**

3.5.1. Irradiação.....**56**

3.5.2. Reconstituição hematopoiética.....**56**

3.5.3. Avaliação do desenvolvimento da DECH aguda.....**57**

3.5.4. Avaliação do escore clínico.....**57**

3.5.5. Avaliação da mortalidade.....**58**

3.5.6. Avaliação histopatológica da DECH.....**58**

3.6. Avaliação do efeito Enxerto Contra Leucemia.....**61**

3.7. Depleção celular.....**61**

3.8. Purificação e transferência adotiva dos linfócitos B esplênicos.....**62**

3.9. Transplante de pele.....**62**

3.10. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) **63**

3.11. Citometria de Fluxo.....**64**

3.11.1. Marcação de moléculas de superfície.....**64**

3.11.2. Marcações intracitoplasmáticas.....**64**

3.11.3. Anticorpos e análise por citometria de fluxo.....**64**

3.12. Análise estatística.....**65**

4.RESULTADOS.....66

4.1.O tratamento do doador com a terapia combinada inibe o desenvolvimento da Doença Enxerto Contra Hospedeiro aguda.....**66**

4.2.A terapia combinada mantém o efeito Enxerto contra Leucemia e a imunocompetência.....**66**

4.3.A proteção contra a DECH aguda não é mediado por células T reguladoras Foxp3+.....**66**

4.4. As células B do doador tolerizadas pela terapia combinada são as responsáveis pela proteção contra DECH aguda.....**71**

4.5.A administração oral de proteínas do receptor em conjunto com L. lactis induz um aumento na expressão de MCH de classe II, CD86 e LAP nas células B esplênicas.....**73**

4.6.A proteção da DECH exercida por célula B induzida pela terapia combinada depende de IL-10.....**80**

4.7.Células B esplênicas do doador tratado com a terapia combinada induzem células reguladoras Foxp3+ no camundongo receptor.....**81**

5.DISCUSSÃO.....84

5.1.A Terapia Combinada e a proteção contra a DECH aguda.....**84**

5.2.Células B como efetoras da tolerância induzida pela terapia combinada.....**87**

5.3. Gerando células B reguladoras com a Terapia combinada.....**95**

6.CONCLUSÕES.....102

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....103

Lista de figuras:

Figura 1.1: Esquema representativo do transplante de células tronco autólogo e heterólogo.....**7**

Figura 1.2: Fisiopatologia da Doença Enxerto Contra Hospedeiro.....**17**

Figura 1.3: Camadas formadoras do epitélio intestinal em humanos.....**23**

Figura 3.1: Esquema do tratamento do doador com a terapia combinada e do transplante de medula óssea.....**55**

Figura 3.2: Esquema de enxertia das peles.....**63**

Figura 4.1: Tratamento do doador com a terapia combinada reduz os sintomas clínicos da DECH aguda.....**67**

Figura 4.2: Camundongos do grupo AgF1/Ll não apresentaram sinais clínicos aparentes após o 30º dia pós-transplante.....**68**

Figure 4.3: Tratamento do doador com a terapia combinada reduz os sintomas histopatológicos da DECH aguda.....**69**

Figura 4.4: O tratamento do doador com a terapia combinada resulta na produção de IL-10 nos órgãos afetados pela DECH aguda no receptor.....**70**

Figura 4.5: A terapia combinada reduz o desenvolvimento da DECH de maneira específica e duradoura.....**71**

Figura 4.6: A terapia combinada preserva o efeito enxerto contra leucemia.....**72**

Figura 4.7: A terapia combinada não afeta a distribuição da população de leucócitos no baço do doador tratado.....**73**

Figura 4.8: A eliminação das células T $CD25^{+}$ do doador antes do transplante não afeta a proteção conferida pela terapia combinada.....**74**

Figura 4.9: A proteção do camundongo receptor contra a DECH é dependente das células B geradas nos doadores pela terapia combinada.....**76**

Figura 4.10: Células B geradas pela terapia combinada nos doadores são fenotipicamente compatíveis com células B reguladoras.....**78**

Figura 4.11: A proteção do camundongo receptor contra a DECH é dependente das células LAP^+ geradas no doador pela terapia combinada.....**79**

Figura 4.12: A proteção do camundongo receptor contra a DECH é dependente da IL-10 produzida pelas células B tolerizadas.....**81**

Figura 4.13: Células B geradas pela terapia combinada aumentam a frequência de células $Foxp3^+$ no camundongo receptor.....**83**

Figura 5.1: Geração da proteção contra a DECH aguda induzida pelo tratamento do doador com a terapia combinada.....**99**

Lista de tabelas:

Tabela 1.1: Estadiamento da DECHa por órgão afetado.....**11**

Tabela 1.2: Estadiamento geral da DECHa.....**12**

Lista de quadros:

Quadro 3.1: Parâmetros para avaliação clínica da DECH.....**58**

Quadro 3.2: Parâmetros para avaliação histológica da pele.....**59**

Quadro 3.3: Parâmetros para avaliação histológica do cólon.....**60**

Quadro 3.4: Parâmetros para avaliação histológica do fígado.....**60**

Lista de abreviaturas:

APC – Célula apresentadora de antígenos

Breg – Célula B reguladora

CTLA-4 – Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DC – Células dendríticas

DECH – Doença Enxerto contra Hospedeiro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAE – Encefalomielite Autoimune Experimental

ECL – (Efeito) Enxerto contra Leucemia

ELISA – Enzime-linked Immunosorbent Assay

FASL – Ligante de Fas

Foxp3 – Forkhead Box p3

G-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos

GFP – Green flourescent protein (proteína verde fluorescente)

HEL – Lisozima de ovo de galinha

HLA – Human leucocyte antigens (antígenos leucocitários humanos)

IBD – Inflammatory bowel disease (doença inflamatório intestinal)

IFN – Interferon

IL – Interleucina

KGF– Fator de Crescimento de Queratinócitos (Keratinocyte Growth Factor)

KO – *Knockout*

LNm – Linfonodos mesentéricos

LNp – Linfonodos periféricos

LNs – Linfonodos

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

miHAs – minor Histocompatibility Antigens

MO – Medula Óssea

mTEC – Células epitelial tímica medular

NFAT – Fator de transcrição das células T ativadas

NK – Natural Killer

NOD - Nucleotide oligomerization domain

OVA - Ovalbumina

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS – Solução tampão de fosfato

pMHC – Complexo peptídeo-MHC

PMN – Polimorfonucleares

PP – Placa de Peyer

RNA – Ácido ribonucleico

SFB – Soro fetal bovino

Sg – Sangue

STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription

TCR – Receptor da célula T

TCTH – Transplante de células-tronco Hematopoiéticas

Teff – Célula T efetora ativada

TGF – Fator de crescimento tumoral

TLR – Receptores tipo Toll

Treg – Células T reguladoras

TSLP – Linfopoetina tímica estromal

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas (TCTH):

O transplante de células-tronco hematopoiéticas é atualmente empregado como tratamento para distúrbios na hematopoiese medular, seja ela congênita ou adquirida, disfunções do sistema imunológico (casos de imunodeficiência ou autoimunidade) ou tumores sólidos (APPELBAUM, 2003). A ideia da transferência de células-tronco (CTH) que originam o tecido hematológico surgiu com as observações de Fabricius-Moller em 1922 e 27 anos mais tarde com os experimentos de Jacobson e colaboradores. Ambos demonstraram que o tecido esplênico, uma vez protegido da irradiação corpórea total (TBI - Total Body Irradiation), era capaz de aliviar seus efeitos mieloablativos (revisado por DUPONT, 1997). Mais tarde, em 1951, Lorenz provou que a infusão de células da medula óssea também conferia proteção à irradiação, apesar de não estabelecer qual o fator responsável por esse efeito protetor (revisado por WELNIAK, BLAZAR & MURPHY, 2007). Em 1952, Jacobson e colaboradores observaram que camundongos que recebiam células heterólogas, provenientes de apêndices de coelhos, também sobreviviam a TBI e postularam que o fator responsável por essa proteção era humoral. No entanto, em 1954, Barnes e Loutit reviram as próprias experiências e a de outros pesquisadores e concluíram que tal hipótese inicial, de que a proteção dada pela infusão de células era humoral, não excluía por completo a possibilidade de envolver um fator celular.

Dados definitivos que confirmaram a reconstituição da celularidade medular vieram apenas em 1956, com as observações de Ford e colaboradores. Os autores constataram que, após a reconstituição hematopoiética, a medula óssea dos camundongos receptores e doadores passavam a ter as mesmas características citogenéticas (FORD, *et al.*, 1956). O fator celular responsável pela reconstituição hematopoética, entretanto, foi descrito mais tarde por Till e McCulloch (1961) que, ao demonstrarem a formação de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos que receberam TBI letal, descreveram os progenitores hematopoéticos.

A utilização do transplante de medula óssea (TMO) em humanos como terapia alternativa para diversas patologias obteve sucesso ainda no início da década de 60, quando Edward Donnall Thomas tratou um paciente com leucemia em estado terminal com TBI e posteriormente transplantou medula óssea do seu irmão gêmeo. Este procedimento foi suficiente para dar ao paciente transplantado 3 meses de sobrevida livre de recaída (THOMAS & LOCHTE *et al*., 1959). Dessa forma, foi demonstrado que também em humanos a infusão de células de medula óssea era capaz de resgatar a hematopoiese após o tratamento

radioterápico (HOROWITZ, 1999; THOMAS & STORB, 1999). Esse procedimento foi então repetido exaustivamente em vítimas de acidentes nucleares. No entanto, estas tentativas, realizadas anteriormente ao conhecimento da importância da histo-compatibilidade, só alcançavam o sucesso em indivíduos que tiveram a recuperação da própria medula óssea (HOROWITZ, 1999; THOMAS & STORB, 1999).

Com a evolução do conhecimento sobre compatibilidade imunológica aumentou muito o sucesso do transplante de medula óssea entre indivíduos diferentes (transplante alogenico). Apenas no ano de 2009, de acordo com dados do Centro Internacional para Pesquisa em Transplante de Sangue e Medula (CIBMTR), foram realizados mais de 50 mil transplantes no mundo (PASQUINI & WANG, 2010), evidenciando, assim, o grande avanço dessa terapia.

1.1.1. Regime de Condicionamento:

O sucesso do transplante de medula óssea está ligado ao regime preparativo ou de condicionamento ao qual o paciente é submetido previamente ao transplante (WELNIAK, BLAZAR & MURPHY, 2007). Os principais objetivos de um protocolo eficaz de condicionamento são i. Eliminar ou suprimir a imunidade do receptor, prevenindo a possível rejeição do enxerto; ii. Gerar o espaço necessário ao estabelecimento da medula óssea a ser enxertada; e, principalmente, iii. Tratar a patologia de base, processo que é mieloablativo (SHLOMCHIK, 2007).

Apesar de fundamental para o transplante, o regime de condicionamento é, em maior ou em menor grau, tóxico para o paciente devido à sua natureza inespecífica. Dessa forma, tanto a radio quanto a quimioterapia ao eliminarem células em proliferação, como aquelas afetadas pela doença, atingem também tecidos saudáveis com alta taxa proliferativa, como a mucosa intestinal (GRATWHOL, 2004) e o tecido hematopoiético. É comum como resultado do condicionamento os pacientes apresentarem náuseas e vômitos além de toxicidade pulmonar, hepática, de bexiga, mucosite oral, alopécia, entre outros (LANGFORD, 1997).

A classificação da intensidade/tipo de regime de condicionamento é baseada nos agentes utilizados, nas suas doses e no calendário de tratamento (PASQUINI & WANG, 2010). Dentre os diversos sistemas de classificação existentes, o mais aceito define dois tipos de regimes principais: o Regime de Condicionamento Mieloablativo e o Regime de Condicionamento de Intensidade Reduzida ou RIC (Reduced Intensity Conditioning). O primeiro regime envolve a administração de doses superiores a 9mg/kg de busulfan ou

superiores a 150mg/m^2 de melfalan como agentes únicos ou em combinação a outras drogas, além de irradiação corpórea total com doses superiores a 900cGy ou doses fracionadas de, no máximo, 800cGy (PASQUINI & WANG, 2010). A grande restrição deste regime de condicionamento é a toxicidade, uma limitação para pacientes idosos, pacientes refratários a tratamentos múltiplos ou combinados ou pacientes que apresentam algum dano órgão-específico. Já o RIC utiliza doses menores de tratamentos citorredutores e incorpora mais diretamente agentes imunossupressores, como a fludarabina, um análogo de purina. Neste regime é possível incluir, ainda, a irradiação corpórea total fracionada em doses menores às mencionadas anteriormente (WELNIAK, BLAZAR & MURPHY, 2007) e a administração de anticorpos monoclonais específicos para antígenos tumorais que ou carreiam radionucleotídeos, aumentando a dose de radiação apenas na região do tumor, ou bloqueiam receptores importantes para a manutenção da sobrevida da célula tumoral (MATTHEWS *et al*., 1999). A escolha do regime apropriado para cada paciente é dependente do estado de saúde geral do mesmo bem como da doença a ser tratada e da fonte de células-tronco a ser usada (APPELBAUM, 2003).

1.1.2. Fontes de células-tronco hematopoiéticas:

Os transplantes de células-tronco hematopoiéticas podem ser classificados de acordo com a fonte anatômica das células a serem enxertadas (APPELBAUM, 2003).

A medula óssea é uma fonte rica em células-tronco hematopoiéticas e foi praticamente a única fonte de células doadoras até os anos 90 (WELNIAK, BLAZAR & MURPHY, 2007). Em indivíduos adultos a medula óssea localiza-se principalmente nos ossos chatos como no esterno e na crista ilíaca. A coleta de CTH convencional consiste na punção da crista ilíaca e aspiração da medula. Como este procedimento é invasivo ao doador e requer sua internação e anestesia geral, iniciou-se uma busca por procedimentos menos invasivos e que facilitassem a doação de CTHs (GRATAMA *et al*., 1997). O primeiro passo foi, então, a descoberta de fontes alternativas de células-tronco como, por exemplo, o sangue de cordão umbilical (SCU).

A utilização do sangue de cordão umbilical como fonte de células-tronco oferece duas vantagens sobre as outras fontes. Primeiro não é necessário nenhum procedimento invasivo para sua obtenção ou que haja compatibilidade HLA total entre doador e receptor, facilitando a escolha do primeiro. O mecanismo por trás deste fato ainda não está totalmente esclarecido, mas parece ser resultado de um conjunto de características inerentes a este tecido, como a alta frequência de células T reguladoras, se comparada ao sangue periférico, e a imaturidade das

células neonatais. Outro exemplo, que pode estar relacionada à essa alta taxa de células reguladoras no SCU, são as próprias células dendríticas. Estas células apresentam baixa expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC de classe II, favorecendo a diferenciação dos linfócitos T para um fenótipo regulador em detrimento do fenótipo inflamatório (ENCABO *et al*., 2007; NADERI *et al*., 2009). Complementando estes dados, Chem e colaboradores (2006) demonstraram que as células T $CD4^+$ do SCU apresentam ativação e diferenciação defeituosa em resposta a aloantígenos.

O sangue de cordão umbilical, no entanto, apresenta um rendimento menor que um aspirado convencional e, consequentemente, contém uma quantidade de CTH capaz de reconstituir apenas a hematopoiese de crianças ou adultos com peso inferior a 50 Kg (CHAO *et al*., 2004). Este fato, bem como a idade do paciente e o maior grau de incompatibilidade foram associados à demora no estabelecimento da enxertia e ao aumento de falhas do transplante (RUBINSTEIN *et al*., 1998). Desta forma, visando aumentar a utilidade do SCU como fonte de CTHs para transplantes em adultos, diversos estudos têm sido realizados para tentar expandi-las *in vitro* (DOUAY 2001; DA SILVA *et al*., 2005; DA SILVIA *et al*., 2010; KEDONG *et al*., 2010; ANDRADE *et al*., 2010; ANDRADE *et al.*, 2011; YU *et al*., 2013). No entanto, até o momento ainda não se obteve sucesso na expansão das células tronco preservando sua capacidade pluripotente por períodos mais longos (ANDRADE *et al*., 2013). Alternativamente, a tem sido utilizada a infusão de sangue de dois ou mais cordões combinados, a fim de aumentar a quantidade de células-tronco por quilo de peso, necessárias para o estabelecimento hematopoiético (LISTER *et al*., 2007).

As células-tronco representam de 0,01 a 0,03% do total de células do sangue periférico, números insuficientes para uma coleta adequada à doação. A partir da década de 90, entretanto, a utilização de drogas como o fator estimulador de colônia de granulócitos ou G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) permitiu o aumento de mais de vinte vezes nos níveis circulantes de células-tronco no sangue (NERVI *et al*., 2006), após cinco doses subcutâneas, e o tornou a terceira, e atualmente mais utilizada, fonte de células-tronco para o transplante.

O G-CSF é produzido por monócitos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, granulócitos e fibroblastos ativados. Seu recombinante é uma glicoproteína monomérica de 19kDa utilizada na clínica médica para mobilizar CTHs da medula óssea para o sangue (NERVI *et al*., 2006). Esta mobilização ocorre através da modificação do padrão de expressão de moléculas de adesão. Neutrófilos ativados pelo G-CSF liberam serino-proteases

que clivam moléculas importantes da interação CTH-estroma, como SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1), VCAM-1 (CD 106 - Vascular Cell Adhesion Molecule 1) e cKit (SABROE *et al*., 2005). Concomitante a isso, há a regulação positiva da expressão de KC (quimiocina derivada de queratinócito) e Groβ (oncogene-beta regulado por crescimento), contribuindo para a liberação de neutrófilos (BORREGAARD, 2010). Todos estes mecanismos fazem com que a contagem de granulócitos na periferia aumente em 10X após uma única injeção subcutânea de rhG-CSF (SHOCHAT *et al*., 2007). A coleta é feita através de uma aférese, que coleta células de baixa densidade a cada ciclo e devolve os demais produtos ao doador. Com isto, após o processamento de duas ou mais volemias, obtém-se número de progenitores suficientes para o transplante sem ter havido grandes riscos para o doador.

Independente da fonte utilizada, o transplante é realizado por infusão das CTHs, perifericamente, por simples transfusão sanguínea. Uma vez infudidas, as CTHs migram para o microambiente medular onde são retidas por interações entre as moléculas de adesão do endotélio vascular e as suas integrinas, encontrando assim todas as condições ótimas para o restabelecimento hematopoiético (QUESENBERRY *et al*., 2005). Em seguida, as células iniciam o processo de proliferação e diferenciação, reconstituindo por fim o sistema hematopoiético. Esta reconstituição é acompanhada clinicamente pelas contagens periféricas de neutrófilos e plaquetas. No momento em que estas contagens atingem um número mínimo, caracteriza-se a "pega" clínica, ou seja, a granulopoiese e a megacariocitopoiese estão reconstituídos (THOMAS & STORB, 1999).

O período entre a infusão e a pega clínica varia, por exemplo, em virtude da fonte das células-tronco. Transplantes realizados com células-tronco mobilizadas para o sangue periférico (TCTP) apresentam a pega clínica em períodos muito menores quando comparadas com fontes como a MO e o SCU (BERGER *et al*., 1999; RINGDEN *et al*., 1999; RINGDEN *et al*., 2000). Nos dois últimos a granulopoiese é reconstituída em torno de 28 e 35 dias, respectivamente (CHAO *et al*., 2004). Já os TCTP apresentam apenas 15 dias de aplasia nestes setores. Isto tem uma grande importância clínica, visto que um período de aplasia granulopoiética menor diminui a gravidade e incidência de infecções oportunistas. Outro lado positivo é que há uma menor necessidade de transfusões de produtos hemoterápicos como plaquetas e hemácias, reduzindo assim os custos, o tempo de internação e os riscos associados. Ainda não se sabe o exato motivo pelo qual a pega é antecipada, mas provavelmente o maior número dos progenitores mielóides já parcialmente diferenciados, presentes no TCTP, contribui para a pega clínica. Outra diferença extremamente interessante,

é que o transplante onde o SCU é utilizado como fonte de CTH apresenta a reconstituição da linfopoiese B mais acelerada que as outras fontes (BROXMEYER & SMITH, 1999). Este fato deve-se provavelmente a presença de precursores dos linfócitos B em grande quantidade no SCU.

1.1.3. Doadores de células-tronco hematopoiéticas:

Indepente do regime de condicionamento e da fonte das células a serem infundidas, pode-se descrever o TCTH quanto à relação entre o doador e o receptor (APPELBAUM, 2003). Dessa forma, os transplantes podem ser autólogos e heterólogos.

O transplante autólogo tem como princípio a coleta de células-tronco hematopoiéticas do próprio indivíduo e a criopreservação dessas células a fim de manter sua viabilidade e capacidade proliferativa durante o período em que o mesmo estiver recebendo o tratamento para a doença de base. Ao fim do tratamento, as células-tronco são reinfundidas no indivíduo para restaurar a função hematopoiética (COTTLER-FOX, 1996; APPELBAUM, 2003).

Já nos transplantes feitos entre indivíduos diferentes, a preparação do doador e a coleta das CTHs são realizadas concomitantemente ao condicionamento do receptor. Este tipo de transplante pode ser descrito como singeneico, onde a doação das células-tronco é feita por um indivíduo geneticamente idêntico ao receptor, ou seja, um irmão gêmeo univitelino; ou como alogeneico, realizado entre indivíduos geneticamente diferentes. Neste último acaso, procura-se um par doador-receptor que seja histocompatível para maximizar o sucesso do transplante (figura 1) (HOROWITZ, 1990).

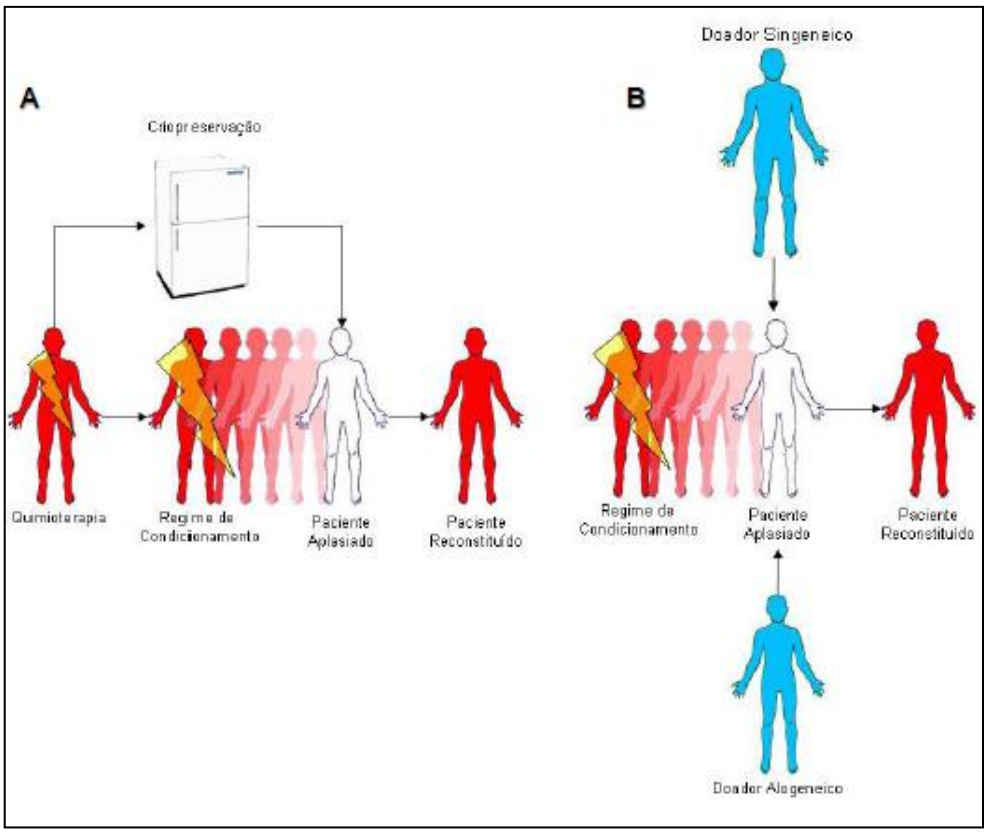

Figura 1.1: Esquema representativo do transplante de células tronco autólogo e heterólogo. A. No transplante autólogo, é feita a coleta de células-tronco hematopoiéticas do próprio indivíduo e a criopreservação dessas células a fim de manter sua viabilidade e capacidade proliferativa durante o período em que o mesmo estiver recebendo o tratamento para a patologia de base. Ao fim do tratamento, as células-tronco são reinfundidas no indivíduo para restaurar a função hematopoiética. **B.** No transplante heterólogo o doador e o receptor são indivíduos diferentes. Este ainda pode subdividir-se em transplante singeneico, onde a doação das células-tronco é feita por um indivíduo geneticamente idêntico ao receptor e alogeneico, onde o doador e o receptor são indivíduos geneticamente diferentes. (Por Galvani, R.).

A base da histocompatibilidade é o Sistema de Antígeno Leucocitário Humano (HLA-Human Leucocyte Antigen), análogo humano do sistema multigênico conhecido como Complexo de Histocompatibilidade Principal ou MHC (Major Histocompatibility Complex). Localizado no braço curto do cromossomo 6, o MHC se expande por mais de 4 megabases e inclui um número superior a 200 genes (KLEIN & SATO, 2000). No transplante de células-tronco alogeneicas entre humanos, os genes mais influentes são o HLA-A, HLA-B e HLA-C, coletivamente chamados de Classe I, e DRB-1, DQB1 e DPB1, coletivamente conhecidos como classe II (MARSH *et al*., 2000). Dentre as principais características dos genes HLA são o alto grau de polimorfismo refletido nos mais de 1000 alelos de classe I e II já relatados (DONADI *et al*., 2003), e a expressão em co-dominância, garantindo assim que uma única célula possa apresentar até 6 moléculas de classe I e até 12 moléculas de classe II distintas.

As moléculas de HLA são fundamentais na ativação das células T uma vez que são capazes de ligar peptídeos e os apresentar a estas células. As moléculas de classe I estão presentes em todas as células nucleadas e são responsáveis pela apresentação do antígeno às células T $CD8^+$. Já as moléculas de classe II estão presentes nas células apresentadoras de antígenos (macrófagos, linfócitos B e células dendríticas) e são responsáveis pela apresentação de peptídeos às células T $CD4^+$. Durante seu processo de maturação, os linfócitos T passam por dois processos seletivos no timo de modo que sejam capazes de reconhecer e responder a peptídeos estranhos complexados a moléculas de HLA próprias e a não responder quando são peptídeos próprios complexados a estas moléculas. No entanto, uma característica marcante neste sistema de apresentação e reconhecimento de antígenos é o fato de que as células T respondem vigorosamente a moléculas de HLA não próprios, formando assim, a base do alo-reconhecimento, principal causa de rejeição de transplantes entre indivíduos HLA-incompatíveis (PARHAN, 1992).

Os peptídeos apresentados pelas moléculas de HLA podem derivar de fontes externas como vírus, por exemplo, mas em sua maioria são derivados de proteínas endógenas. Assim, no contexto do transplante, polimorfismos nos genes que codificam estas proteínas as tornam antígenos de histocompatibilidade menores (miHA-Minor Histocompatibility Antigen) formando a base da incompatibilidade imunológica entre indivíduos HLA-compatíveis (APPELBAUM, 2003).

A incompatibilidade imunológica entre o doador e o receptor apresenta duas conseqüências principais para o uso de CTH alogeneicas como imunoterapia: i. Rejeição do enxerto por células imunocompetentes do receptor; e ii. O reconhecimento de antígenos normais de tecidos do receptor por células imunocompetentes do doador, presentes no enxerto. Neste último caso, há o desencadeamento de uma síndrome conhecida como **D**oença do **E**nxerto **C**ontra **H**ospedeiro ou DECH (APPELBAUM, 2003). Estes fatos tornam a procura por um doador compatível para a realização do TCTH alogeneico extremamente difícil.

1.2. Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH):

A principal intercorrência em pacientes alo-transplantados e a maior barreira para a plena utilização terapêutica do TCTH alogeneico atualmente é a doença enxerto contra hospedeiro (CHAO *et al*., 2004; VOGELSANG *et al*., 2003). Trata-se, em termos simplificados, de uma reação alogeneica mediada por linfócitos T do doador frente aos

tecidos do hospedeiro, resultando em uma intensa destruição tecidual e falência funcional dos órgãos acometidos (REDDY & FERRARA, 2003).

Assim como o próprio TCTH, a doença enxerto contra hospedeiro foi inicialmente observada em modelos experimentais e posteriormente confirmada em humanos. Na verdade, o entendimento desta patologia confunde-se com a descoberta da tolerância imunológica central descrita por Peter Medawar em 1951 (revisado por BRENT, 1995).

Em 1943, Medawar já havia demonstrado que camundongos adultos transplantados com peles de diferentes linhagens rejeitavam esta nova pele, e mais, um segundo transplante levava a uma rejeição acelerada, com falha na enxertia em um intervalo de tempo menor. Isto sugeriu que os animais sensibilizados apresentavam alguma memória imunológica para o fenômeno da rejeição. Utilizando esta experiência, Medawar em conjunto com Rupert Billingham, realizaram uma série de transferências de pele entre bovinos com o objetivo de identificar se eram gêmeos monozigóticos ou dizigóticos. Eles esperavam que se os animais fossem gêmeos monozigóticos e, portanto, idênticos, as peles seriam aceitas. Já se os animais fossem gêmeos dizigóticos e, portanto geneticamente diferentes, as peles seriam rejeitadas. Contudo, ficaram surpresos ao constatar que todas as peles foram aceitas independentemente da identidade genética dos bezerros (revisado por BRENT, 1995).

A explicação veio logo em 1945 quando Owen descreveu uma anastomose natural que ocorria entre gêmeos dizigóticos de bovinos *in útero* e que levava ao quimerismo de hemácias nestes animais (revisado por BRENT, 1995).

Todos estes dados levaram Medawar e Billingham a mostrar, em 1951, que o contato do feto com antígenos alogeneicos permitia o desenvolvimento de tolerância aos mesmos antígenos na vida adulta (revisado por BRENT, 2005). Mais tarde em 1957, Leslie Brent, em colaboração com Medawar e Billingham, observou que um número considerável de camundongos neonatos, que haviam recebido injeções intravenosas com células de indivíduos adultos, morria entre duas e três semanas. Necropsias realizadas nestes animais revelaram retardo no crescimento, atrofia linfonodal e, na maioria, esplenomegalia. Brent, Medawar e Billingham chamaram esta doença de "*runting disease*" e já postulavam que esse fenômeno era iniciado pelo reconhecimento de antígenos do hospedeiro pelas células do doador (revisado por BRENT, 1995). No mesmo ano, Simonsen descreveu uma patologia análoga em galinhas utilizando a esplenomegalia como índice de doença (revisado por BRENT 2005).

Os progressos realizados levaram Billingham a postular, em 1966, três condições essenciais para o desenvolvimento da "*runting disease*": i. O doador e o receptor não devem ser histocompatíveis; ii. O enxerto deve conter células imunocompetentes; e iii. O receptor deve ser incapaz de rejeitar adequadamente o enxerto, pelo menos por um período suficiente para o estabelecimento de uma resposta alogeneica (BILLINGHAM, 1966).

Anos mais tarde foi observado que humanos também desenvolviam uma patologia bastante similar a "*runting disease*" após serem submetidos a um regime de condicionamento quimio ou radioterápico seguido de transfusão sanguínea ou TCTH. Essa doença, inicialmente chamada de doença secundária ao transplante, passou a ser conhecida por doença enxerto contra hospedeiro (DECH) e ainda hoje as condições essenciais para o seu desenvolvimento são aquelas postuladas por Billingham.

1.2.1. Aspectos Clínicos da DECH:

De acordo com a clínica médica, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, a DECH pode ser dividida em aguda (DECHa), crônica (DECHc) ou ainda mista (DECHm) quando possui simultaneamente características de ambas as patologias. Inicialmente a divisão entre aguda e crônica era baseada no tempo pós-transplante em os sintomas apareciam: se a doença se desenvolvia em menos de 100 dias após o TCTH, era classificada como aguda. Após esse período, era classificada como crônica. Todavia, a determinação do tipo de doença baseado no tempo pós-transplante mostrou-se errônea, não apenas porque o regime de condicionamento de intensidade reduzida retardou o aparecimento da forma aguda da doença, como também se demonstrou que as formas aguda e crônica envolvem processos patológicos distintos entre si (FERRARA *et al.*, 2009; BLAZAR, MURPHY & ABEDI, 2012).

A forma crônica da DECH acomete cerca de 30-65% dos receptores alogeneicos e possui inúmeros fatores comuns às doenças autoimunes vasculares, como o desenvolvimento de esclerodermia, fascite, síndrome seca nos olhos e cavidade oral, além da produção de autoanticorpos e depósitos de imunocomplexos nos rins (FERRARA *et al.*, 2009). O paciente pode desenvolver a forma crônica sem ter desenvolvido a forma aguda (DECH *de novo*), em seguida à forma aguda (DECH progressiva) ou ainda concomitante à DECHa (DECH quiescente) (DEVERGIE, 2004). O estadiamento da doença pode ser dividido em limitado, quando apenas um órgão é atingido ou sistêmico/difuso quando mais de um órgão ou sistema são acometidos. Neste último caso, a doença é extremamente debilitante, levando à morte

entre 30-50% dos pacientes em um período de até 5 anos. Esta elevada taxa de mortalidade se deve principalmente a desregulação do sistema imunológico e infecções oportunistas (BLAZAR, MURPHY & ABEDI, 2012).

Apesar da alta morbidade e mortalidade associadas à forma crônica da doença, sua patofisiologia é pouco conhecida e a falta de modelos experimentais que mimetizem os achados clínicos dificulta ainda mais os avanços nesta área.

Já a DECH aguda (DECHa) é caracterizada por componentes inflamatórios. Evolui clinicamente com danos na pele, intestino e fígado com a severidade podendo variar de 1 a 4 de acordo com o comprometimento da pele, volume de diarreia e níveis de bilirrubina encontrados no sangue (tabela 1) (GOKER *et al.*, 2001). O acometimento da pele ocorre mais inicialmente e se correlaciona com a enxertia das células do hospedeiro. O paciente apresenta lesões maculopapulares nas palmas das mãos, planta dos pés orelha e mucosa oral. As lesões eritematosas podem evoluir para eritemas confluentes (grau III) e consequente comprometimento da subepiderme (grau IV) e aparecimento de ulcerações, disceratose e infiltração linfocitária perivascular na derme (GOKER *et al.*, 2001). O principal sinal de envolvimento do trato gastrointestinal é a diarreia, acompanhada ou não de sintomas de comprometimento do trato gastrointestinal alto, como anorexia, náuseas e emese. A forma mais severa se manifesta com dores abdominais intensas, sangramento ocasional e paralisação do íleo (NEVO *et al.*, 1999). Já o acometimento do fígado é normalmente confundido com sintomas causados pelo regime de condicionamento, resultando, por exemplo, em endotelialite, infiltrado linfocitário dos espaços-porta, pericolangite (inflamação das vias biliares intra-hepáticas) e destruição do ducto biliar (FUJII *et al.*, 2001). A manifestação clínica mais comum é a hiperbilirrubinemia, aumento da fosfatase alcalina (ARAI *et al.*, 2002) e, em menor grau, dos níveis de transaminases (AKPEK *et al.*, 2002).

Tabela 1.1 - Estadiamento da DECHa por órgão afetado

Órgão	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Pele	Lesões <25% do corpo	Lesões em 25-50% do corpo	Eritrodermia generalizada	Eritrodermia generalizada com formação de bolhas
Intestino	Diarréia >0,5L/dia	Diarréia >1L/dia	Diarréia >1,5L/dia	Diarréia >2L/dia e dor abdominal severa
Fígado	Bilirrubina 2-3mg/dL	Bilirrubina 3,1-6mg/dL	Bilirrubina 6,1-15mg/dL	Bilirrubina >15mg/dL

Em termos de severidade a DECHa também pode variar de 1 a 4, de acordo com o acometimento dos órgãos supracitados e uma escala de como a doença está afetando os hábitos diários da pessoa – performance ECOG (tabela 2). Já a incidência e a mortalidade da DECHa variam muito de acordo com o estudo, centro de pesquisa, doença de base ou mesmo identidade HLA, podendo variar de 20 a 70% a primeira e 30 a 90% a segunda (GOKER *et al.*, 2001; BLAZAR, MURPHY & ABEDI, 2012).

Tabela 1.2 - Estadiamento geral da DECHa

Estadiamento Geral	Estadiamento órgão específico				Performance ECOG
	Pele	Fígado		Intestino	
I (muito limitado)	1 a 2	0		0	0
II (moderadamente severo)	1 a 3	1	e/ou	1	0-1
III (severo / multiórgão)	2 a 3	2 a 4	e/ou	2 a 3	2-3
IV (potencialmente letal)	2 a 4	2 a 4	e/ou	2 a 4	3-4

Dentre os fatores de risco associados à DECHa e inerentes aos doadores pode-se destacar o grau de histocompatibilidade com o receptor, sendo a organização haplotípica dos genes HLA-A, B e DR, o mais influente; disparidades entre sexo, onde um risco maior é associado à combinação de um doador feminino com um receptor masculino (KOLLMAN *et al*., 2001); aloimunizações prévias, como ocorre em doadoras multíparas ou doadores de ambos os sexos submetidos à múltiplas transfusões de sangue; fonte de células-tronco, destacando-se a menor incidência de doença quando é utilizado SCU (ROCHA *et al*., 2000) e incidências comparáveis quando utilizado sangue periférico ou MO (revisado por APPELBAUM, 2003); e finalmente o número de linfócitos infudidos (KORNGOLD & SPRENT, 1999).

Já entre os fatores de risco associados aos receptores encontram-se a idade do paciente que, quanto mais velho, maior a incidência de DECH (ORDERMANN *et al*., 2002); o regime de condicionamento, sendo demonstrado que a utilização de RIC diminui a incidência de DECH (SANDMAIER *et al*., 2007); o regime imunossupressor pós-transplante; e uma certa predisposição genética. Neste último caso foi demonstrado que polimorfismos em genes de citocinas como IL-10 (LAGUILA *et al*., 2005) e TNFα (TAKAHASHI *et al*., 2000) têm associação à probabilidade de desenvolvimento da DECHa.

1.2.2. A Imunobiologia da DECH:

Como citado anteriormente, a DECH é uma doença complexa que resulta do alo-reconhecimento do receptor por células imunocompetentes presentes no enxerto. Os principais órgãos atingidos pela forma aguda são o trato gastrointestinal, fígado, pele e pulmão, criando assim uma série de discussões sobre a correlação entre a infecção nestes sítios e o desenvolvimento da DECH (CHAO, 1996; FERRARA & ANTIN, 1999). Diversos pesquisadores propuseram que a DECH aguda apresenta 4 fases principais (MURPHY & BLAZAR, 1999; REDDY & FERRARA, 2003): i. O regime de condicionamento; ii. A fase indutora; iii. A fase de expansão clonal e recrutamento celular; e iv. A fase efetora da DECH aguda (figura 2).

A primeira fase ocorre ainda durante o regime de condicionamento, antes da infusão das células. De fato há diversas evidências que correlacionam a utilização do regime de condicionamento mieloablativo com uma maior incidência de DECH (SANDMAIER *et al*., 2007; SCHWARTE *et al*., 2007). Essa correlação se deve a danos teciduais causados pelo regime de condicionamento, que por sua vez, levam à produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e a interleucina-1 (IL-1), um fenômeno chamado de "*Cytokine Storm"* (FERRARA,1998). Estas citocinas provocam a super-expressão de moléculas de adesão e de moléculas de MHC (REDDY & FERRARA, 2003). Todas estas alterações inflamatórias teciduais podem resultar em um aumento na apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) do receptor criando um ambiente propício à ativação das células imunes que serão posteriormente infundidas.

O regime de condicionamento induz ainda a quebra de barreiras epiteliais, como a da mucosa intestinal. Esta quebra permite a translocação de bactérias e seus produtos do lúmen intestinal para a circulação sistêmica, aumentando ainda mais a ativação da imunidade inata do hospedeiro (HILL *et al*.,1997; COOKE *et al*., 1998). A primeira descrição de uma possível correlação entre a ativação da imunidade inata e o desencadeamento da DECH foi feita por Jones e colaboradores (1971) ao transferirem a medula óssea de animais DBA/2 para animais C3H/He, convencionais ou livres de patógenos (*germ free*), previamente irradiados. Os autores observaram uma sobrevida de 98% das quimeras *germ free* quatro meses após o transplante, enquanto todas as quimeras convencionais haviam morrido por complicações da DECH. Ainda no início da década de 70, van Bekkum e colaboradores (1974) confirmaram os dados de Jones ao transferirem células de medula óssea de camundongos C57Bl/Rij para camundongos CBA e observarem 95% de mortalidade após 100 dias. Já os animais controles

germ free ou que foram previamente tratados com antibióticos apresentaram um atraso na curva de mortalidade e sintomas mais leves de DECH aguda. Este mesmo grupo utilizou com sucesso implantes intestinais em camundongos *germ free* para demonstrar que o grau de dano histológico é correlacionado positivamente com a presença de bactérias no intestino (VAN BEKKUN *et al*., 1977).

Outra demonstração experimental importante da relação entre a quebra de barreira epitelial e translocação bacteriana com a DECHa foi observada por Krijanovski e colaboradores (1999). Quimeras tratadas com o fator de crescimento de queratinócitos (KGF), apresentaram um aumento na sobrevida. O KGF ao induzir o crescimento de células epiteliais do tecido intestinal lesado foi eficaz no controle da DECH. Nesta mesma linha, Takashima e colaboradores (2011) demonstraram que, por serem alvo da DECH, as células-tronco intestinais não eram capazes de restaurar a arquitetura normal do intestino após o transplante. Os autores mostraram, então, que o tratamento das quimeras com R-Espondina 1 (R-Spo1), um agonista de Wnt, foi capaz de proteger as células-tronco intestinais dos danos causados pelo regime de condicionamento aumentando, assim, a restauração do tecido intestinal lesado e inibindo a subseqüente cascata de citocinas inflamatórias. Por este mecanismo, a R-Espondina 1 foi capaz de melhorar a DECH sistêmica no modelo utilizado.

Inúmeras evidências que correlacionam polimorfismos em genes que codificam moléculas da imunidade inata como o TLR4 (ELMAAGACLI *et al*., 2006) e NOD2/CARD15 (HOLLER *et al*., 2004) e uma maior incidência de DECHa em humanos, embora esses dados sejam contraditórios, se comparados a outros trabalhos na literatura. Em modelos experimentais há evidências mais consistentes. Chakraverty e colaboradores (2006) demonstraram, por exemplo, que a aplicação de um ativador de TLR 7 na pele de camundongos antes da indução da DECH resultou em um infiltrado maciço de células T acompanhado de destruição tecidual apenas no local pré-tratado. Foi mostrado também que a inibição de TLR 9 ou MyD88 (*Myeloid Differentiation Primarly-Response protein 88*), uma proteína adaptadora necessária para a sinalização da maioria das moléculas do tipo Toll, diminui a incidência e severidade da DECH intestinal (HEIMESAAT *et al*., 2010).

É válido ressaltar também a participação de outras moléculas, conhecidas como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs - *Danger-Associated Molecular Patterns*) liberados com o dano tecidual induzido pelo regime de condicionamento. Um exemplo desta participação foi dado pelo trabalho de Wilhelm e colaboradores (2010) em que se demonstrou que tanto as células intestinais em processo de morte celular como também fluidos peritoneais de pacientes com DECH liberavam ATP. Esta molécula se liga ao receptor P2X7 nas células

apresentadoras de antígeno do receptor ativando o inflamossoma e induzindo a superregulação de moléculas co-estimuadoras nestas células.

Enfim, esses e outros dados reforçaram a hipótese de que os linfócitos sensibilizados contra antígenos microbianos e sob a influência do ambiente inflamatório reagem contra antígenos epiteliais nesta fase da DECH. Esta hipótese tornou-se a mais aceita e atualmente em humanos os regimes de condicionamento são precedidos por "descontaminação" bacteriana com antibiótico-terapia em alguns centros ou pincipalmente quando a disparidade nos genes HLA entre doador e receptor é maior (BEELEN *et al*., 1999).

A segunda fase caracteriza-se pela indução da ativação da célula T e se inicia com o reconhecimento e interação dos receptores dessas células com o complexo MHC-peptídeo, seu ligante cognato, presente na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). A participação e a necessidade das células apresentadoras de antígeno profissionais do receptor ou do doador para o desenvolvimento da DECH em humanos ainda gera discussões, uma vez que dados obtidos experimentalmente variam de acordo com o modelo murino utilizado. Enquanto na DECH aguda dependente de células T $CD8^+$ a apresentação de por moléculas de classe I presentes nas APCs tanto do doador quanto do receptor é considerada importante no desencadeamento da doença (MATTE *et al*., 2004; SHLOMCHIK *et al*., 1999), no modelo dependente de células T $CD4^+$, acreditava-se que apenas as APCs hematopoiéticas do receptor eram necessárias no desencadeamento da DECH. No entanto dados recentes demonstraram que as células APCs profissionais presentes nos órgãos linfoides secundários teriam apenas uma capacidade limitada de induzir a doença, e mais, células parenquimais, que adquiriam funções de apresentadoras de antígenos, poderiam promover a expansão de células alorreativas do doador no trato gastrointestinal dos receptores (KOYAMA *et al*., 2012; WANG *et al*., 2011). Ou seja, pelo menos em modelos experimentais de DECH aguda, a doença poderia ser iniciada por células APCs não-hematopoiéticas do receptor. Outra célula proveniente do doador que poderia ter um papel importante na apresentação de alo-antígenos às células T seriam os linfócitos B. Contudo, se esta apresentação resulta em um fenótipo inflamatório e, portanto, favorável à DECH, ou em um fenótipo regulador, que consequentemente protege do desenvolvimento da doença, ainda é uma questão contraditória (SCHULTZ *et al*.,1995; KNOECHEL, *et al*., 2005).

Quanto ao local da ativação dos linfócitos T durante esta fase, acreditou-se por muito tempo que apenas determinados órgãos linfóides secundários, como os linfonodos mesentéricos e placas de Peyer, teriam uma importância maior no desencadeamento desse processo. No entanto, em 2008, Beilhack e colaboradores demonstraram que havia apenas duas maneiras de prevenir a ativação dos linfócitos T. A primeira seria o bloqueio da

migração dessas células para os órgãos linfóides secundários através de anticorpos monoclonais anti-MAdCAM-1 e anti-L-selectina em conjunto a uma esplenectomia. A segunda maneira seria a retirada de todos os órgãos linfóides secundários. Apesar da impossibilidade de tais procedimentos na clínica médica, esses resultados esclareceram duas questões muito importantes desta fase: i. A ativação da célula T ocorre na presença do aloantígeno, não importando sua localização; e ii. A ativação pode ocorrer em qualquer órgão linfóide secundário e uma vez que tenha acontecido, a migração e injúria dos órgãos-alvo seguirá independentemente do sítio onde as células foram primadas.

Na terceira fase do desenvolvimento da DECH, as células T alorreativas ativadas na fase anterior iniciam uma expansão clonal e diferenciação nos subtipos Th1, Th2 ou Th17 dependendo das citocinas existentes no microambiente. Uma vez ativados, os linfócitos passam a secretar citocinas, dentre elas IL-2, que age sobre os próprios linfócitos aumentando sua proliferação, e IFN-γ que aumenta a expressão de moléculas associadas à apresentação de antígenos e ao dano à mucosa intestinal. Há então um aumento na translocação bacteriana e na ativação dos macrófagos. Estes são de grande importância para a produção de mais citocinas pró-inflamatórias, estabelecendo uma alça de amplificação da inflamação (LAPP *et al*., 1992). Mais recentemente, Hanash e colaboradores (2012) demonstraram que a IL-22 é um fator crítico na proteção do tecido intestinal durante a DECH e na manutenção da barreira. Segundo os autores, um dano tecidual, como o causado pelo regime de condicionamento, induz a produção de IL-23 pelas células epiteliais do intestino. Esta citocina age sobre as células linfóides inatas do receptor, células imunes radio-resistentes ali presentes, que passam a produzir IL-22. A produção de IL-22 é capaz então de proteger do dano causado pela irradiação tanto as células-tronco intestinais quanto o próprio epitélio maduro. No entanto, a eliminação das células linfóides inatas durante a DECH leva a uma deficiência de IL-22, resultando em um aumento na patologia intestinal e na perda da barreira intestinal.

A quarta e última fase é caracterizada pela migração das células ativadas para os órgãos-alvo da DECH. Esses tecidos tornam-se sítios inflamatórios, levando ao recrutamento de monócitos, células *Natural Killers* e células polimorfonucleares (PMNs), que por sua vez também produzem mediadores inflamatórios. Assim, através de um mecanismo de retroalimentação positiva, há o aumento da inflamação nesses tecidos. Além disto, há citotoxidade direta ou mediada por anticorpos atuando nas células teciduais de maneira específica (WELNIAK, BLAZAR & MURPHY, 2007).

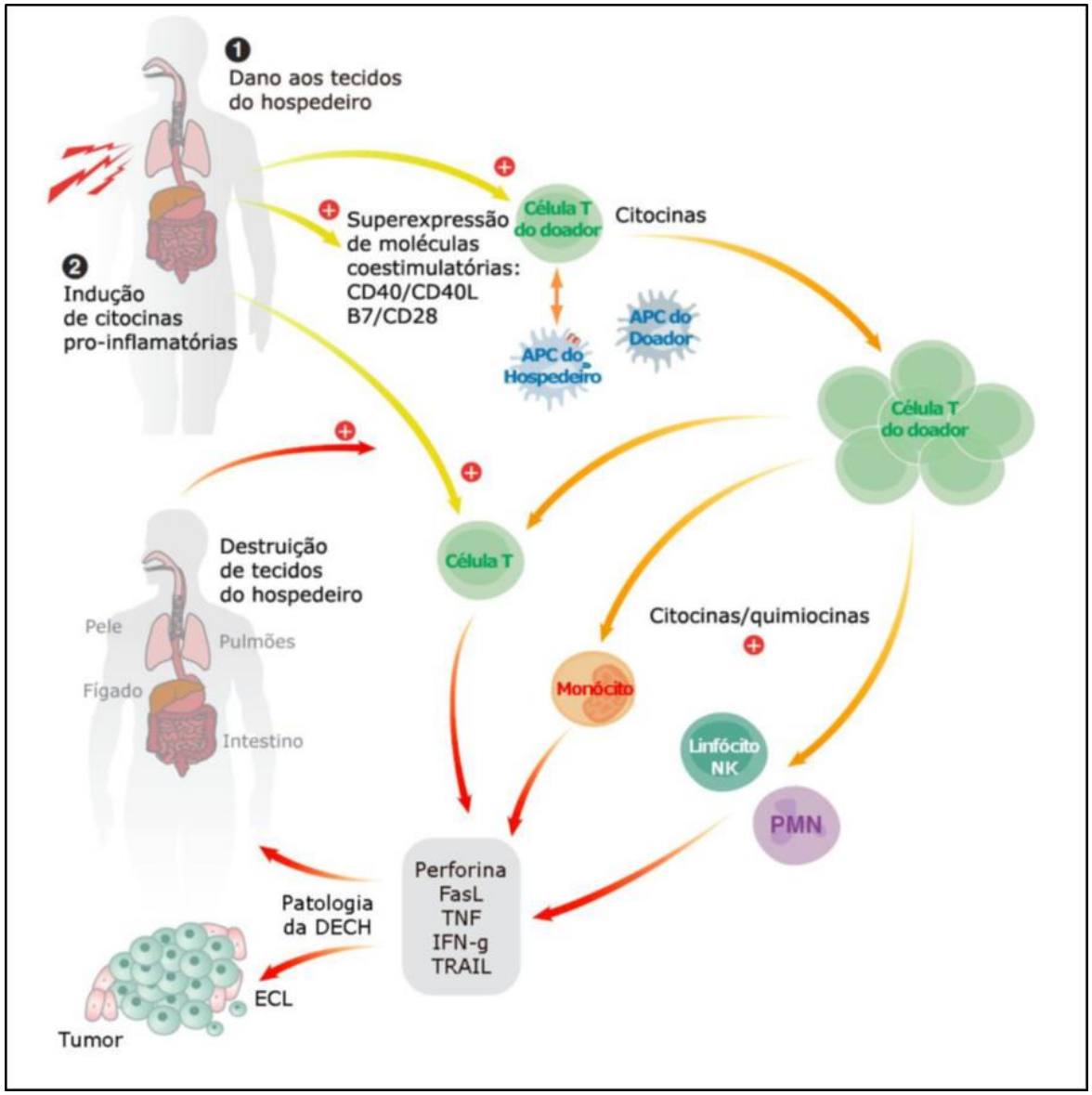

Figura 1.2: Fisiopatologia da Doença Enxerto Contra Hospedeiro. (Adaptado de WELNIAK, BLAZAR & MURPHY, 2007).

Recentemente Yi e colaboradores (2009), demonstraram que os subtipos de células T (Th1, Th2, e Th17) exercem perfis patogênicos diferentes na DECH. No modelo experimental, quando predominantemente diferenciadas em células Th1, o dano tecidual foi visto preferencialmente no intestino e fígado. Na ausência de IFN-γ houve uma diferenciação em Th2 e Th17 com dano tecidual exacerbado no pulmão e na pele. A ausência de IL-4 e IFN-γ resultou na diferenciação aumentada em Th17 e danos teciduais na pele, embora não tenham sido exclusivos deste tecido. Finalmente, a ausência de IFN-γ e IL-17 levou ao aumento da diferenciação em Th2 e ao aparecimento de pneumonia idiopática. A DECH tecido-específica mediada por Th1, Th2 e Th17 foi associada, em parte, à expressão diferencial de receptores de quimiocinas nestas células. Embora de grande importância para o

entendimento da patologia da DECH aguda experimental, estes resultados podem não refletir o que acontece em humanos. Um estudo realizado por Broady e colaboradores (2010) com 50 pacientes que receberam TCTH alogeneico demonstrou que a DECH cutânea está associada à expansão células Th1 tecido-específicas e não às células Th 17 como visto por Yi e colaboradores.

Em relação à forma crônica da DECH, o desenvolvimento da patologia ainda é muito mal caracterizado no que diz respeito aos mecanismos celulares. Sabe-se apenas que os linfócitos também são responsáveis pelo seu desenvolvimento, embora haja incertezas se essas células foram àquelas infundidas inicialmente e/ou se são células diferenciadas no hospedeiro e que passaram por um timo alterado pelo tratamento e incapaz de realizar uma seleção negativa eficaz (SAKODA *et al*., 2007; ZHANG *et al*., 2007).

1.2.3. Profilaxia e tratamento da DECH:

A prevenção da DECHa é iniciada antes mesmo do transplante de células-tronco hematopoéticas, e é baseado na imunossupressão do paciente com metotrexato (MTX) a curto prazo e ciclosporina A (CSA) mais a longo prazo (SORROR *et al*., 2005). Essa combinação tornou-se padrão global na profilaxia da DECH após estudos randomizados mostrarem uma diminuição no aparecimento de DECH graus III e IV com subsequente melhora na sobrevida dos pacientes com leucemia e anemia aplástica (SORROR *et al*., 2005; LOCATELLI *et al*., 2000). A administração de ciclosporina, no entanto, resulta em toxicidade renal, hipertensão, tremores e neurotoxicidade (LOUGHRAN *et al*., 1985), o que requer terapia de suporte além do monitoramento dos níveis séricos da droga.

O gerenciamento inicial da DECH é realizado por meio de esteroides. No caso da DECH na pele de grau I aconselha-se a utilização de corticoides tópicos. Já para o tratamento sistêmico, indicado para pacientes com grau II-IV baseia-se na continuação da profilaxia com ciclosporina (ou Tacrolimus) em adição à metilprednisolona. Doses variadas foram utilizadas, mas a mais comumente recomendada é a de 2mg/kg, dada em doses fracionadas, uma vez que doses mais elevadas levam a diversos efeitos colaterais e danos metabólicos severos, incluindo hiperglicemia, retenção de líquidos, enfraquecimento muscular e aumento na taxa de complicações infecciosas (MARTIN *et al*., 1990; JACOBSOHN & VOGELSANG., 2002). O tempo médio para o tratamento é de 30-42 dias nos pacientes que respondem à terapia. Após este período recomenda-se a diminuição progressiva da dose, embora não exista nenhum consenso relativo à melhor forma de diminuição destes esteroides (HINGS *et al*., 1993).

Aproximadamente 50% dos pacientes que são tratados com esteróides na fase inicial da doença alcançam uma resposta parcial ou completa à terapia (MARTIN *et al*., 1990). O restante dos pacientes necessita de uma terapia secundária para o tratamento da chamada DECHa refratária à esteroides. Quanto à sua administração, mais uma vez não há consenso e numerosos agentes têm sido avaliados. Um exemplo é a globulina antimocítica (ATG), anticorpos policlonais derivados de coelho (Genzyme®) ou cavalo (Pfizer®) específicos para células T humanas. Apesar de diferentes trabalhos mostrarem a sua eficácia (RUUTU *et al*., 1997; HINGS *et al*., 1993; ROY *et al*., 1992), sua aplicação está associada à alta morbidade e elevada taxa de mortalidade, principalmente devido a complicações infecciosas. O ATG pode causar reações febris, hipotensão, trombocitopenia, e em casos raros, reações anafiláticas. Pacientes pré-tratados com ATG podem desenvolver ainda desordens linfoproliferativas no pós-transplante, geralmente associadas ao vírus Epstein-Barr (EBV). Entretanto, cerca de 20 a 50% dos pacientes melhoram com a administração do ATG, e, no caso da DECH cutânea, são observadas respostas em cerca de 60 a 75% dos pacientes (DEEG, 2007).

Anticorpos monoclonais tais como daclizumab (anti-IL-2R), visilizumab, infliximab e alemtuzumab (anti-CD52) têm sido avaliados no tratamento e prevenção da DECHa. Em comum, apresentam baixa toxicidade uma vez que reconhecem especificamente células ou citocinas envolvidas na patofisiologia da doença, como o TNF-α (Infliximab) e a cadeia ε da molécula CD3 (vilizumab). Uma estratégia para aumentar a eficácia dos anticorpos monoclonais ou ligantes biológicos tem sido associá-los a uma toxina (imunotoxina). Um exemplo é a denileucina diftitox, que liga ao receptor da IL-2 (CD25). Após a ligação da droga ao CD25, o fragmento catalítico A da toxina é translocado para o citoplasma, interferindo com a síntese proteica da célula, induzindo sua morte (HO *et al*., 2004).

Outra abordagem para o tratamento da DECHa refratária a esteroides é a fotoferese extracorpórea (ECP, do inglês extracorporeal photopheresis), onde o paciente é ligado a uma máquina de aférese e seus leucócitos são recolhidos por centrifugação diferencial, e expostos ao 8-metoxipsoraleno, seguido de radiação UVA antes de retornarem ao paciente. A ECP leva a apoptose dos leucócitos ativos dentro de 24 a 48 horas seguintes (GREINIX *et al*., 2000).

1.2.4. A Doença Enxerto Contra Hospedeiro X Efeito Enxerto Contra Leucemia:

Assim que ficou claro que a célula T era a responsável pela DECH aguda, uma das primeiras tentativas de controle da doença foi a retirada dos linfócitos do enxerto a ser infundido. Esse procedimento realmente impediu o desenvolvimento da DECHa, mas

evidenciou outros papéis do linfócito T que antes eram desconhecidos no TCTH. Primeiramente, o papel de facilitador da pega do enxerto, visto que nesses transplantes ocorria uma maior incidência da falência medular. Estes dados sugeriam que o linfócito T poderia ser responsável pela produção de fatores de crescimento indispensáveis à hematopoiese (MONTEIRO *et al*., 2005), ou ainda, que poderia impedir a rejeição mediada por células imuno-competentes residuais do hospedeiro (CUDKOWICZ & BENNETT, 1971a; 1971b).

Paralelamente, uma série de evidências apontava para outro papel dos linfócitos T nos transplantes de medula óssea. Ainda em 1956, Barnes e colaboradores demonstraram que animais que haviam recebido uma dose de irradiação insuficiente para eliminar as células leucêmicas previamente inoculadas e eram reconstituídos com a medula óssea provenientes de doadores da mesma linhagem, morriam em decorrência do crescimento tumoral. No entanto, quando estes animais eram reconstituídos com a medula óssea de doadores de uma linhagem diferente, havia a eliminação tumoral, embora o grupo de receptores ainda apresentasse uma elevada taxa de mortalidade associada a um quadro de diarreia crônica. Mais tarde esses dados foram corroborados por análises retrospectivas da recaída da doença de base em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco. Em um destes estudos foi demonstrado que a reincidência da doença primária foi mais elevada em pacientes reconstituídos com medula óssea singeneica ou reconstituídos com enxertos depletados de células T. No entanto, a taxa de recaída da doença de base era progressivamente menor em pacientes reconstituídos com medula óssea alogeneica completa e que não desenvolveram a DECH, pacientes que desenvolveram apenas uma das formas da doença e pacientes que desenvolveram ambas as formas de doença (HOROW *et al*., 1990).

Assim, demonstrou-se que as mesmas células T alorreativas responsáveis pela doença enxerto contra hospedeiro eram também necessárias para a eliminação total do tumor, através de um efeito que foi chamado de enxerto contra leucemia (ECL). Da mesma forma que a DECH, o efeito ECL necessita de disparidades genéticas entre o par doador-receptor e é mediada por linfócitos T contidos ou derivados do enxerto hematopoiético (WARREN & DEEG, 2013). O efeito enxerto contra leucemia não é um fenômeno único e homólogo, acredita-se que os mecanismos que medeiam este efeito em um receptor transplantado são em grande parte determinados pelo grau e natureza da disparidade genética entre doador e receptor, composição e processamento do enxerto hematopoiético e, principalmente, do tipo de tumor que está sendo tratado (WARREN & DEEG, 2013; BLEAKLEY & RIDDELL, 2004). De fato, um estudo retrospectivo realizado pelo Grupo Europeu para Transplante de Medula Óssea e Sangue entre os anos de 1998 e 2007 com 48.111 pacientes mostrou que a atividade ECL – inferida pela recaída ou não da doença de base após o transplante – foi

significantemente associada ao desenvolvimento de DECH em pacientes com leucemia mielóide crônica ou com leucemia linfóide aguda; essa associação foi menor em pacientes com linfomas e síndrome mielodisplásica e fracamente associada à DECH em pacientes com leucemia mielóide aguda (STERN *et al*., 2012).

As células imunes implicadas no efeito ECL são as já comentadas células T (tanto as células $TCD4^+$ quanto as células $TCD8^+$) e as células *Natural Killers* (NK). Como em humanos os transplantes são realizados entre indivíduos HLA-compatíveis, acredita-se que antígenos de histocompatibilidade menores sirvam de alvos nas reações de enxerto contra hospedeiro e enxerto contra leucemia. Baseado nesta ideia foi proposto que a expressão diferencial de genes que codificam antígenos de histocompatibilidade menor nos tecidos serviria de base para a segregação do efeito ECL e DECH. Ou seja, as células T que reconhecem antígenos expressos somente nas células hematopoiéticas do receptor, incluindo, neste caso, as células leucêmicas, poderiam contribuir para a eliminação do tumor sem que haja o desenvolvimento da DECH. Alternativamente, as células T que reconhecem antígenos expressos tanto por células hematopoiéticas quanto pelo epitélio do receptor contribuiriam para ambos os efeitos (BLEAKLEY & RIDDELL, 2004). No entanto, esta visão mostrou-se simplista e estudos em modelos experimentais demonstraram que o fenótipo e o perfil de citocinas produzido pelas células T alorreativas determinavam a injúria tecidual. Teshima e colaboradores (2002) mostraram a expressão de moléculas de MHC apenas nas células hematopoiéticas era sufuciente para levar a DECH com lesão de epitélio cutâneo mediado por TNFα e IL-1.

Além deste, outros trabalhos procuraram identificar moléculas e mecanismos envolvidos na segregação dos dois efeitos. Reddy e colaboradores (2003) observaram que o pré-tratamento dos doadores de medula óssea com IL-18 foi associado com a polarização dependente de STAT-6 das células T para um fenótipo Th2, capaz de atenuar o desenvolvimento da DECH, sem prejuízo para o efeito enxerto contra leucemia. Já Schmaltz e colaboradores (2001) demonstraram que em modelos de transplante de medula óssea onde há disparidade entre MHC de classe I e II, a via de Fas/FasL é a principal responsável pela reação do enxerto contra hospedeiro, visto que a transferência de células T deficientes em FasL reduziu a mortalidade associada à doença, embora não tenha afetado o efeito ECL. No entanto, quando linfócitos deficientes em perforina foram transferidos, houve uma perda significante da citotoxicidade anti-tumoral mediada por essas células, enquanto o efeito enxerto contra hospedeiro foi mantido, sugerindo que os linfócitos T do doador usam mecanismos citotóxicos diferentes para atividade anti-hospedeiro e anti-leucemia.

Apesar do número cada vez maior de trabalhos que buscam a segregação de ambos os efeitos, a doença enxerto contra hospedeiro e o efeito enxerto contra leucemia ainda são vistos como efeitos interdependentes e muitos esforços têm sido feitos para reduzir o primeiro enquanto se mantêm o outro (WELNIAK, BLAZAR & MURPHY, 2007).

1.3. O Intestino:

O trato-gatrointestinal apresenta como característica principal o fato de ser a maior superfície do corpo humano exposta ao ambiente externo, com uma área que varia de 200 a 300m^2. Trata-se de um longo tubo conector entre a cavidade oral e o ânus, dividido em quatro seções principais: i. Esôfago, através do qual água e alimentos chegam ao estômago; ii. Estômago, um reservatório onde a digestão é iniciada; iii. Intestino delgado, responsável pela absorção de água e nutrientes; e iv. Intestino grosso, responsável pela absorção final de água e eletrólitos, além da compactação e liberação do bolo fecal (CORUZZI, 2010).

A maior parte do trato-gastrointestinal é o intestino propriamente. Como mencionado, este é dividido em intestino delgado, que varia de 3 a 5m em humanos, podendo ser subdividido em duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, e intestino grosso, que pode chegar a 1,5m, podendo também ser subdividido em ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmóide e reto. A principal função do intestino é a digestão e absorção do alimento visando a obtenção de energia para o organismo e preservar a homeostasia de fluídos e eletrólitos. Assim, para manter esta demanda e ao mesmo tempo preservar a sua integridade, um elaborado sistema de células altamente especializadas que inclui neurônios, células endócrinas e parácrinas, células musculares e imunes asseguram a regulação de secreção, absorção, motilidade e proteção de uma maneira finamente orquestrada. Para tanto, o intestino delgado e o intestino grosso compartilham entre si a mesma estrutura básica que compreende quatro camadas principais: Serosa, *muscularis própria*, submucosa e mucosa (KAHN & DAUM, 2010) (Figura 2).

A camada mais externa, chamada de serosa, é formada por um tecido conectivo coberto por células mesoteliais. É seguida pela camada *muscularis própria*, que é formada por dois feixes de músculo liso, um circular mais interno e outro longitudial mais externo, dispostos em um padrão helicoidal. Entre estes feixes encontra-se um conjunto de fibras nervosas chamado de Plexo de Auerbach (KAHN & DAUM, 2010). Esta camada é responsável pelo ritmo dos movimentos peristálticos que empulsiona a comida digerida ao longo do tubo em direção ao reto (BAKER *et al*., 2010). A camada intermediária, conhecida como submucosa, é formada por um tecido conectivo fibroso que contém fibroblastos,

mastócitos, vasos linfáticos e sanguíneos além de um conjunto de fibras nervosas (Plexo de Meissner). A mucosa é a camada mais interna e é constituída por três subcamadas: i. *muscularis mucosa*, uma fina camada de músculo liso que se liga à submucosa; ii. *Lamina própria*, uma camada intermediária de tecido conectivo reticular formado por elastina, reticulina e fibras de colágeno e onde é possível encontrar linfócitos, células plasmáticas, granulócitos bem como vasos linfáticos e capilares; e finalmente iii. Mucosa, uma camada de epitélio de absorção (KAHN & DAUM, 2010).

A arquitetura da mucosa é a principal diferença entre o intestino delgado e o cólon, refletindo suas funções distintas *in vivo*: a mucosa do intestino delgado procura maximizar a área disponível para a absorção por meio de protrusões em forma de dedos, os chamados vilus, que se projetam para o lúmen (Pregas de Kerkring), encontrados em associação com invaginações, chamadas de criptas de Lieberkühn; já a superfície do cólon é essencialmente plana, com muitas criptas que penetram na submucosa subjacente. A ausência de vilus nesta região reflete o papel principal do cólon na compactação do bolo fecal (KAHN & DAUM, 2010).

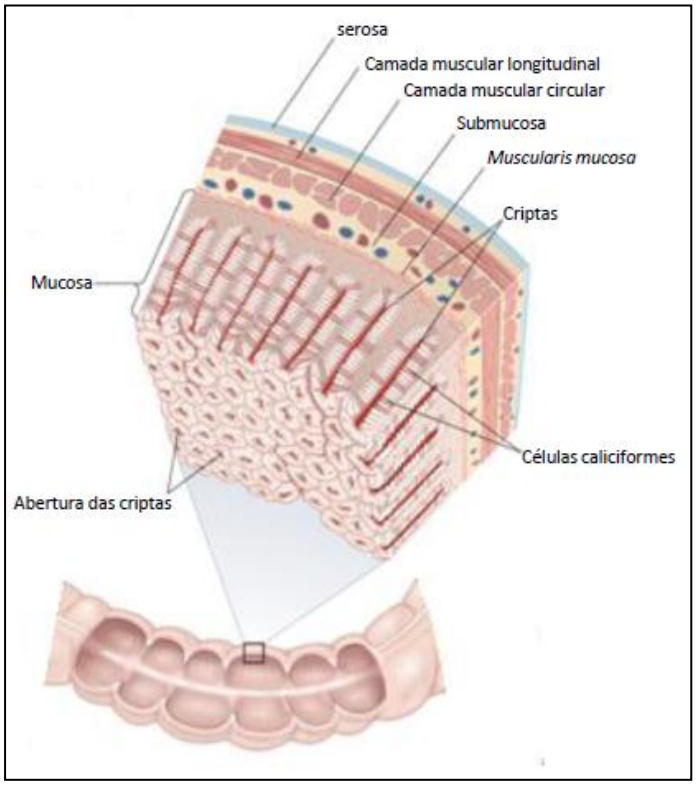

Figura 1.3: Camadas formadoras do epitélio intestinal em humanos. Adaptado de KAHN & DAUM (2010).

A composição celular precisa do epitélio intestinal também varia entre as diferentes regiões anatômicas do intestino delgado e cólon. Os enterócitos, também conhecidos como células *columnares*, constituem mais de 80% de todas as células intestinais. São interligados

por junções oclusivas, formando uma verdadeira barreira epitelial. São células altamente polarizadas e apresentam microvilosidades que aumentam a área de absorção intestinal em até 600X (TLASKALOVA-HOGENOVA *et al*., 2005). Estas células controlam o transporte de nutrientes e eletrólitos entre o lúmen intestinal e a *lamina própria*.

As células caliciformes possuem uma função protetora contra danos físicos e químicos do intestino e são responsáveis pela produção e secreção de glicoproteínas de alto peso molecular, chamada de mucinas. Estas moléculas são compostas por um esqueleto proteico ligado a cadeias laterais de oligossacarídeos higroscópicos e hidrofílicos formando uma matriz de gel que cobre todo o epitélio intestinal e, em conjunto com peptídeos antimicrobianos, são considerados a primeira linha de defesa no intestino contra patógenos orais (VAN DER FLIER & CLEVERS, 2009). A proporção de células caliciformes no intestino varia de 4% no duodeno a 16% no cólon descendente (KARAM, 1999).

Já as células de Paneth estão localizadas no interior das criptas e secretam grânulos que contêm proteínas específicas, incluindo lisozimas e defensinas, responsáveis pela defesa do epitélio do intestino delgado contra patógenos (VAN DER FLIER & CLEVERS, 2009).

Finalmente, as células entero-endócrinas, ou neuroendócrinas, coordenam o funcionamento do intestino através da produção e secreção de hormônios. Existem mais de 15 subtipos de células neuroendócrinas, definidas de acordo com a sua morfologia e expressão específica de hormônios intestinais e de marcadores genéticos. Estas células são escassas e representam apenas 1% das células do lúmen intestinal (SCHONHOFF, GIEL-MOLONEY & LEITER, 2004).

Ao longo de todo o intestino encontra-se ainda um tecido linfoide associado a ele. Este tecido consiste em linfócitos difusos por todo o epitélio e lamina própria, além de agregados organizados conhecidos como Placas de Peyer e linfonodos mesentéricos.

As placas de peyer são agregados linfóides macroscópicos encontrados na submucosa do intestino delgado e são formados principalmente por folículos de células B entremeados por áreas de células T. A área linfóide é separada do lúmen intestinal por uma camada única de enterócitos modificados que formam o epitélio associado ao folículo. A característica mais notável deste epitélio é a presença de células M, enterócitos especializados que não possuem microvilosidades e são responsáveis pela captação de antígenos do lúmen intestinal e, pela via de transporte vesicular transepitelial, entregam estes antígenos, para a sua posterior apresentação, pelas células apresentadoras de antígenos profissionais, aos linfócitos encontrados no interior das placas de Peyer (MOWAT, 2003).

Os linfonodos mesentéricos são os maiores entre todos os linfonodos e seu desenvolvimento é diferente dos demais e da placa de Peyer, uma vez que não é afetado pela

ausência da maioria dos fatores envolvidos na ontogenia destes outros tecidos linfoides, incluindo TNF, TNFR, $LT\alpha_1\beta_2$ e LTβR. O acúmulo de linfócitos neste linfonodo requer tanto a L-selectina quanto a integrina $\alpha_4\beta_7$, moléculas de adesão que direcionam a entrada de linfócitos nos tecidos periférico e de mucosa, respectivamente. Como resultado, os linfonodos mesentéricos podem ser considerados a via de ligação entre a circulação periférica e a circulação da mucosa (WAGNER *et al*., 1998).

O epitélio intestinal é renovado a partir das células-tronco presentes nas criptas. Ao receberem o sinal adequado, estas células iniciam um processo de divisão e originam células-filhas que migram lateralmente na cripta, conforme as células da região apical dos vilos vão entrando em apoptose. Durante esta migração, as células iniciam sua diferenciação em enterócitos maduros ou em células caliciformes. As células de Paneth, ao contrário das demais, migram em direção a base da cripta, onde normalmente são localizadas. Esse processo é capaz de renovar o epitélio intestinal humano a cada 5 dias e a cada 2-3 dias em camundongos, ratos e gatos (TLASKALOVA-HOGENOVA *et al*., 2005).

1.3.1. A microbiota intestinal:

Os microrganismos são a forma de vida mais abundante na Terra. Apesar de existirem espécies de vida livre, várias delas encontram-se e são dependentes de interações com organismos multicelulares. Estas interações, benéficas ou patogênicas, são essenciais em nematódeos, plantas, insetos, peixes, pássaros e mamíferos (HILL & ARTIE, 2010).

Os mamíferos apresentam eucariotos, archeobactérias e eubactérias colonizando suas superfícies epiteliais e formando uma intricada rede de comunidades de microrganismos nestes locais. É no intestino, porém, que se encontra seu maior reservatório de microrganismos, chegando a um total de 10^{14} indivíduos. Desses, uma densidade de 10^{12} células por mililitro de conteúdo luminal são bactérias que se localizam principalmente na região terminal do intestino delgado e cólon (WHITMAN *et al*., 1998).

Humanos e outros mamíferos nascem de um ambiente estéril e vão, subsequentemente, adquirindo bactérias intestinais ao longo de toda a vida. A colonização *per si* inicia-se já nos primeiros meses após o nascimento e é marcada por duas fases principais: a fase de amamentação e a fase de alimentação sólida (HILL & ARTIE, 2010). A fase de amamentação é aquela em que o lactente recebe, por aleitamento materno, espécies específicas de microrganismos ao mesmo tempo em que é imunizado passivamente por meio de anticorpos que ajudam a moldar e a controlar a comunidade intestinal em desenvolvimento (DIAZ *et al*., 2004). Acredita-se que o aleitamento materno induza uma imunomodulação

intestinal que resulta em infecções subclínicas que gradualmente estimulam a memória contra determinados patógenos enquanto reduz a inflamação (NEWBURG & WALKER, 2007). Adicionado a isto, o leite materno contem diversas moléculas da imunidade inata como lisozima e lactoferrina (LABBO, CLARK & GOLDMAN, 2004; ARMOGIDA *et al*., 2004) além de fatores que modulam a sinalização via receptor do tipo Toll, incluindo um receptor do tipo Toll 2 solúvel. Este, ao competir pela sinalização com o receptor presente nas células do epitélio intestinal, reduz sua reatividade, facilitando o estabelecimento normal de bifidobactérias Gram-prositivas no intestino de neonatos (LEBOUDER *et al*., 2003).

O padrão de tempo/espaço em que ocorre essa colonização inicial é variável entre indivíduos e depende de inúmeros fatores que incluem o país de origem, prematuridade, tipo de parto (natural ou cesariano), histórico de hospitalizações, uso de antibióticos e prática alimentar (tempo de amamentação) (HILL & ARTIE, 2010). A influência de alguns destes fatores foi avaliado em dois trabalhos que analisaram a flora de neonatos. Bullen e colaboradores (1976) demonstraram que crianças nascidas de parto normal e que receberam leite materno, exibiam um predomínio de bifidobactérias (gênero *Bifidobacterium*) em seus intestinos e pequenas proporções de *E. coli*, bactérias do filo Bacteroidetes e do gênero *Clostridium*. Já Grolund e colaboradores (1999) demonstraram que crianças nascidas por cesarianas apresentavam uma cinética de colonização mais demorada do que aquelas nascidas de parto normal, e exibiam ainda baixas freqüências de bifidobactérias e Bacteroidetes além de um predomínio de *Clostridium difficile*.

Todos os indivíduos ao iniciarem uma alimentação sólida, passam para a segunda fase de colonização intestinal e começam a exibir um número maior de espécies bacterianas. De acordo com alguns autores (RENZ-POLSTER *et al*., 2005; SALAM *et al*., 2006) a transição da primeira para a segunda fase pode não ser benéfica visto que observaram uma associação entre alterações induzidas por pressões ambientais como antibióticos, a dieta e a inoculação de microrganismos na flora intestinal do neonato e o risco aumentado para o desenvolvimento de doenças atópicas.

Estudos iniciais da microbiota intestinal que se baseavam na cultura do material fecal, identificaram lactobacilos, estreptococos anaeróbicos e membros do gênero *Bacteroides* como residentes do intestino humano adulto normal. No entanto, uma grande porcentagem das bactérias intestinais é anaeróbica obrigatória e não expressa enzimas necessárias para a detoxificação do oxigênio, fato que as torna incultiváveis (HILL & ARTIE, 2010). Apenas recentemente, com a utilização de técnicas como o DNA *bar coding* e o pirosequenciamento

do RNA 16S foi possível uma caracterização mais acurada das comunidades intestinais. Estes trabalhos (HAYASHI *et al*., 2002; ECKBURG *et al*., 2005) identificaram a presença de aproximadamente 500-1000 espécies diferentes, sendo os filos Firmicutes e Bacteroidetes os principais presentes no intestino de mamíferos. Dentre os Firmicutes, 95% pertencem à classe Clostridia; já entre os Bacteroidetes há uma grande variação de classes entre os diferentes indivíduos. Outros filos como Actinobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia e Proteobacteria estão presentes em menor freqüência. As comunidades de bactérias apresentam diferenças ao longo do cólon e entre os microambientes associados à mucosa intestinal. Isto sugere que comunidades microbianas definidas em diferentes localizações anatômicas são importantes para a fisiologia normal de mamíferos (ECKBURG *et al*., 2005). Estudos recentes demonstraram ainda que alterações na aquisição ou na composição dessas comunidades comensais podem iniciar o curso de inúmeras doenças metabólicas e inflamatórias (ARTIS, 2008).

A presença de microrganismos no intestino não é apenas um fato, mas um fator extremamente importante para mamíferos, uma vez que sinais liberados por estas bactérias promovem a digestão ótima do alimento, mantém a homeostasia epitelial, modulam o metabolismo lipídico, promovem a angiogênese e a função dos nervos entéricos, auxiliam na resistência à infecção e promovem o desenvolvimento normal e a regulação da homeostasia do sistema imunológico associado à mucosa (HILL & ARTIE, 2010).

1.3.2. Mucosa intestinal e sua constante "paz armada":

Os efeitos benéficos da presença de bactérias comensais para a fisiologia do hospedeiro ressaltam a necessidade de uma hiporresponsividade imunológica a essas comunidades microbianas. Paradoxalmente, algum nível de reconhecimento imune inato dessas bactérias comensais é essencial no desenvolvimento e na função normal do sistema imunológico da própria mucosa e da sua periferia. Os maiores exemplos desta necessidade são os camundongos livres de patógenos ou *germ free*. Tais animais não possuem qualquer microrganismo comensal e, por conseguinte, apresentam uma série de alterações na mucosa intestinal, nos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT – **G**ut **A**ssociated **L**ynphoid **T**issues) e no sistema imune periférico (ARTIS, 2008).

Nos camundongos *germ free* a *lamina propria* da mucosa intestinal é mais fina e com menos células; as células de Paneth expressam níveis reduzidos de defensinas e as células epiteliais intestinais possuem microvilos pouco desenvolvidos e expressão diminuída de

receptores como MHC de classe II. O microambiente imunológico desses animais também é afetado. Suas placas de Peyer são menores e em menor número ao longo do intestino. A *lamina propria* é composta por menos células T $CD4^+$ e células B produtoras de IgA (SMITH, MCKOY & MACPHERSON, 2007). Células T TCR Vα7.2-Jα33 ou Vα19-Jα33, uma população de células T não convencional, está ausente nestes animais, sugerindo assim, que a aquisição de bactérias comensais leva à diferenciação, recrutamento e/ou manutenção seletiva dessas células T invariantes associadas à mucosa (TREINER *et al*., 2003). Na periferia, o desenvolvimento de áreas T e B no baço e nos linfonodos periféricos também se encontram alterados. A simples introdução de produtos isolados de *Bacteroides fragilis* corrige este defeito periférico, demonstrando dessa forma que sinais derivados de bactérias comensais são importantes para a função do sistema imunológico como um todo (MAZMANIAN *et al*., 2005).

Todas essas observações indicam que mecanismos moleculares devem existir para facilitar o reconhecimento da microbiota comensal e permitir um nível basal de ativação imunológica de modo a programar padrões de expressão gênica necessários para o desenvolvimento e função normal das células imunes (Artis, 2008). Ao mesmo tempo em que esta ativação basal e controlada acontece de forma dependente da microbiota comensal, a mucosa intestinal e o sistema imunológico associado a ela devem estar aptos a responder de modo rápido e eficiente a microrganismos patogênicos aos quais estão constantemente expostos. Nesta realidade dicotômica, é essencial saber distinguir ao que responder. Frente a isto, pode-se dizer que a mucosa intestinal se encontra em uma condição de paz armada, cujos pilares são as barreiras física, inata e adaptativa.

A arquitetura especializada do epitélio intestinal forma uma verdadeira barreira física contra a penetração dos microrganismos. Dois componentes estruturais são essenciais nesta função (SANSONETTI, 2004): as microvilosiades da borda escova e as junções intercelulares (junções bloqueadoras, junções ancoradouras e junções comunicantes). As microvilosidades estão associadas a uma rede de filamentos de actina ligadas às junções comunicantes e junções oclusivas entre as células do epitélio intestinal (CEIs), auxiliando assim na regulação da permeabilidade e na função de barreira deste epitélio (TURNER *et al*., 1997). As junções bloqueadoras presentes são do tipo junção compacta (ou zônula oclusiva) e são responsáveis pela criação de um gradiente transepitelial. Trata-se, em termos simplificados, de um complexo multiproteico composto por proteínas transmembranares, tais como isoformas de claudinas e ocludinas (FURUSE *et al*., 1998), proteínas de membrana periféricas, como *zonula ocludends 1* (ZO1) e *2* (ZO2), além de moléculas reguladoras (TURNER, 2009).

Imediatamente abaixo das junções oclusivas, encontram-se as junções ancoradouras, que se subdividem em junções aderentes e desmossomos, e junções comunicantes. Ambos formam uma ponte de adesão forte entre células adjacentes e formam entre elas um canal de comunicação intercelular, respectivamente. A perda das junções aderentes e comunicantes resulta na interrupção do contato célula-célula e célula-matriz, que, em última instância, leva a perda da polarização do epitélio, da diferenciação destas células e induz sua apoptose prematura (TURNER, 2009). Em vista disso, componentes bacterianos que interfiram nas funções normais das microvilosidades ou de qualquer das junções intercelulares tendem a enfraquecer a barreira e aumentar sua permeabilidade (SANSONETTI, 2004).

Esta barreira é reforçada pela presença de um glicocálix formado por mucinas que se ligam à membrana apical das CEIs. Uma grossa camada de muco que contém diversas isoformas de mucinas forma um sistema adicional de proteção. As já mencionadas células caliciformes, produtoras do muco, iniciam uma liberação massiva de grânulos de mucina frente a ameaças físicas, químicas ou infecciosas (SPECIAN & NEUTRA, 1980). A camada de muco tem como objetivos a formação de uma barreira protetora semipermeável e o auxílio no reparo de danos físicos à barreira de células epiteliais. As mucinas também podem interagir com polissacarídeos ou proteínas da superfície celular de bactérias, mantendo-as presas nessa camada até que movimentos peristálticos normais do intestino as removam dali (WADOLKOWSKY, LAUX & COHEN, 1988). A acessibilidade à superfície apical do epitélio intestinal e ruptura desta barreira física são capacidades inerentes a microrganismos patogênicos e são a principal diferença que os distinguem dos microrganismos simbiontes (SANSONETTI, 2004).

Na relação entre os microrganismos e o epitélio, a imunidade inata do hospedeiro revela-se em três mecanismos efetores principais que têm como objetivos controlar a densidade apical destes microrganismos e garantir a rápida ativação de mecanismos efetores frente a uma ameaça patogênica. Estes mecanismos são: a produção de peptídeos antimicrobianos, discriminação entre o que é patogênico ou não pelos enterócitos, e a ação de neutrófilos (SANSONETTI, 2004).

Os peptídeos antimicrobianos possuem propriedades anfipáticas que os permitem ligar-se às bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, induzindo a formação de poros nas paredes dessas bactérias (WHITE, WIMLEY & SELSTED, 1995). Como exemplo de classes de peptídeos antimicrobianos pode-se citar as defensinas, produzidas pelas células de Paneth, e as catelicidinas, produzidas pelos enterócitos.

Os enterócitos, por estarem em constante contato com a comunidade microbiana, possuem um papel fundamental no controle da densidade da microbiota e indução de uma resposta inflamatória controlada contra patógenos. Estas células devem, então, distinguir ao que devem responder. Para tanto, são capazes de expressar receptores de reconhecimento de padrão (PRRs – Pattern Recognition Receptors) (MEDZHITOV *et al*., 1997), tais como receptores do tipo Toll e receptores do tipo NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain), que reconhecem motivos conservados encontrados em bactérias e outros microrganismos. Como exemplo pode-se citar RNA viral fita-dupla (reconhecido pelo TLR3), lipopolissacarídeo – LPS – de bactérias Gram-negativas (reconhecido pelo TLR4), flagelina (reconhecido pelo TLR5) ou dipeptídeo muramil (reconhecido pelo NOD2), um componente bacteriano. Aos ligantes destes receptores dá-se o nome de Motivos moleculares associados a patógenos (PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Motifs). Em geral, a ligação entre TLRs e NLRs e seus ligantes resulta na ativação de resposta imune inata, induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos. A questão é que tanto os microrganismos simbiontes quanto os patogênicos expressam PAMPs, logo como diferenciá-los? Os dois mecanismos mais aceitos que tentam responder esta questão são: i. A expressão dos receptores de reconhecimento de padrão fora região de contato com o lúmen e ii. A expressão diferencial desses receptores (SANSONETTI, 2004). De fato foi visto que o TLR5, por exemplo, só é expresso na região basolateral dos enterócitos enquanto os TLR 3, 7, 8 e 9 são expressos exclusivamente em endossomos intracelulales (MEDZHITOV, 2007). Além disso, Abreu e colaboradores (2001) demonstraram que sob condições normais, os enterócitos expressam níveis baixíssimos de TLR4. Apesar destes mecanismos não explicarem totalmente como os enterócitos conseguem distinguir entre os dois tipos de microrganismos, deixa claro que só aqueles que possuem uma capacidade invasiva maior são capazes de se ligar efetivamente a estes receptores. Adicionalmente, foi reportado que alguns PAMPs de simbiontes são menos agonistas aos PRRs do que aqueles apresentados pelos patógenos. Como exemplo, Andersen-Nissen (2005) demonstrou que as categorias de α e ε-Proteobacteriaceae, simbiontes, expressam moléculas de flagelina que se ligam fracamente ao TLR5, não induzindo a sua ativação.

Quando o contato enterócito-microrganismo é realizado e não há outros sinais de invasão, estas células são capazes de regular a homeostasia da mucosa influenciando células dendríticas, macrófagos e linfócitos através da expressão local de citocinas imunorreguladoras, incluindo IL-10, TGF-β, prostaglandina E2, ácido retinóico e IL-25 (HILL & ARTIE, 2010). No entanto, quando este contato acontece concomitantemente a um

dano no epitélio, neutrófilos são recrutados via gradiente de CXCL8 para o lado basal e são, então, translocados pelo epitélio. Uma vez no lúmen, exercem suas funções microbicidas. Durante este processo, os enterócitos iniciam a ativação de vias intracelulares pró-inflamatórias, como a via de NF-κB (**N**uclear **F**actor- **κB**), levando a expressão de inúmeras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que coordenam a resposta inata em curso e modulam a resposta adaptativa ativada a seguir (SANSONETTI, 2004).

A imunidade adaptativa do hospedeiro, neste contexto, tem sua função baseada em três tipos celulares principais: i. Células Dendríticas (DC – Dendritic Cells); ii. Células T $CD4^+$ (inclui-se aqui o balanço entre seus diferentes fenótipos); e iii. Células B plasmocitóides.

No intestino, as células dendríticas apresentam basicamente três fenótipos principais: $CD11c^{hi}CD11b^+CD8\alpha^-$, $CD11c^{hi}CD11b^-CD8\alpha^+$ e $CD11c^{hi}CD11b^-CD8\alpha^-$ com características específicas e funções que variam de acordo com a sua localização anatômica. No intestino delgado, as DCs residem na *lamina própria* (LP DCs), em estruturas linfóides organizadas, como as Placas de Peyer (PP DCs) ou linfonodos terciários e nos linfonodos mesentéricos, onde sua principal função é apresentar antígenos luminais ou próprios às células T (HILL & ARTIE, 2010). As DCs das Placas de Peyer podem ser divididas em três grupos de acordo com a expressão de receptores de quimiocinas, localização dentro da PP e características funcionais: PP DCs $CXCR1^+$ são encontradas em contato com o epitélio associados ao folículo, onde participam, em conjunto com as células M epiteliais, da coleta de antígenos luminais de maneira dependente de PRRs (MILLING *et al*., 2005); PP DCs $CCR6^+$ são encontradas no domínio subepitelial, mas podem migrar rapidamente para o epitélio associado ao folículo em resposta a um estímulo microbiológico (IWASAKI & KELSALL, 2000); Finalmente, as PP DCs $CCR7^+$ são encontradas nas áreas de células T, onde, quando ativadas, são capazes de induzir a conversão de células T $CD4^+$ virgens em células Th1 ou Th17 pela produção de IL-12 e IL-23 (ELSON *et al*., 2005), coordenando assim as respostas destas células, sua migração e produção de IgA (POWRIE, 2004).

Um subtipo de células dendríticas mielóides residentes da *lamina propria* são capazes de expressar proteínas da junção oclusiva, como claudina-4 e ZO-2, que lhes permitem estender seus dendrícitos entre as células do epitélio intestinal, sem romper ou perturbar a permeabilidade da barreira, e captar peptídeos diretamente da região do lúmen intestinal (RESCIGNO *et al*., 2001). Estudos subsequentes demonstraram que duas subpopulações de fagócitos mononucleares $CD11c^+$ estavam presentes na lamina própria: células $CD11c^+CD103^+CD11b^+$ e células $CD11c^{int}CD103^-CD11b^+CXC_3R1^+$ (BOGUNOVIC *et al*.,

2009; Varol *et al*., 2009). Destas, apenas as que expressavam CD103 ($\alpha_E\beta_7$) eram consideradas células dendríticas (BOGUNOVIC *et al*., 2009), enquanto as CXC_3R1^+ acreditava-se tratar de macrófagos residentes (VAROL *et al*., 2009). Comparativamente, as DCs $CD103^+$ pareciam coordenar melhor a resposta imune adaptativa contra antígenos do intestino quando comparados aos macrófagos CXC_3R1^+, pois não apenas expressavam CCR7 (BOGUNOVIC *et al*., 2009), necessário para a migração para o linfonodo mesentérico, como também foram descritos como indutores de células T efetoras ou reguladoras, dependendo do contexto inflamatório (LAFFONT *et al*., 2010) ou tolerogêncio (SUN *et al*., 2007; COOMBES *et al*., 2007) em que se deparavam. Paradoxalmente, Niess e colaboradores (2005) demonstraram que o processo de amostragem do lúmen intestinal por dendrícitos era dependente de Receptor de quimiocina CXC_3 (CX_3CR1) e da ligação via TLR dependente de MyD88 (**M**yeloid **D**ifferentiation primary response gene **88**). Durante algum tempo, sugeriu-se então que uma das formas de captação de antígenos pelas células dendríticas $CD103^+$ era por meio de sua interação com os macrófagos CXC_3R1^+ (RESCIGNO, 2010). No entanto, Farache e colaboradores (2013) mostraram que as próprias células dendríticas $CD103^+$ também são capazes de estender dendritos e captar antígenos diretamente do lúmen de forma CXC_3R1-independente, evidenciando o papel importante desta subpopulação na indução da resposta imune.

As células dendríticas também possuem um papel importante no endereçamento de células T recém-ativadas. As DCs isoladas das PPs, LP do intestino delgado e linfonodo mesentérico, em especial as $CD103^+$ na presença de ácido retinóico, estimulam a expressão de $\alpha_4\beta_7$ e CCR9 em células T $CD4^+$ e em células T $CD8^+$. A integrina $\alpha_4\beta_7$ e o receptor de quimiocina CCR9 se ligam a moléculas constitutivamente expressas pelo epitélio intestinal, a MADCAM1 (Mucosal vascular Addresin Cell-Adhesion Molecule 1) e o CCL25, respectivamente (IWATA *et al*., 2004), direcionando a resposta para este local.

Como mencionado, estudos que comparam camundongos *germ free* e camundongos colonizados com bactérias demonstraram que o sistema imune adaptativo, em particular o compartimento localizado na mucosa, é profundamente moldado pela presença da microbiota comensal do intestino. Essa modulação inclui o aumento no tamanho e no número de centros germinativos nas PPs e no número de células plasmocitóides secretoras de IgA, de células T $CD4^+$ na *lamina propria* e de células intraepiteliais T $CD8^+$ αβ (MACPHERSON & HARRIS, 2004). Além disso, a presença de microrganismos comensais é tolerada sem que haja a formação de um infiltrado inflamatório neutrofílico tanto em camundongos quanto em

humanos saudáveis. Nesta relação mutualística, células T reguladoras $CD4^+$ (Treg) são componentes essenciais (HOOPER & MACPHERSON, 2010).

Os dois principais subtipos de células Treg são as $CD4^+Foxp3^+$ e as $CD4^+Foxp3^-IL\text{-}10^+$. Ambas são encontradas na *lamina propria* do intestino delgado, no entanto, as $Foxp3^-$ também são encontradas no compartimento intraepitelial do intestino delgado enquanto as $Foxp3^+$ estão presentes em maior frequência no cólon (BARNES & POWRIE, 2009). As evidências para o papel-chave das células Treg na regulação imunológica no intestino na presença de microrganismos comensais provieram originalmente de dois tipos de modelo animal. Em ambos os casos, a regulação imunológica só era necessária quando camundongos eram colonizados com microrganismos intestinais (HOOPER & MACPHERSON, 2010). No primeiro modelo, havia o desenvolvimento de inflamação intestinal espontânea quando camundongos eram deficientes em citocinas reguladoras como interleucina 10 (IL-10) (KUHN *et al*., 1993) e TGF-β (Transforming Growth Factor (SHULL *et al*., 1992) ou em fatores que determinam a seleção tímica de células Treg (como o gene 5 relacionado com a autofagia - ATG 5) (NEDJIC *et al*., 2008), sua diferenciação e/ou função (Foxp3 – Forkhead Box p3 ou a integrina αVβ8) (HOOPER & MACPHERSON, 2010). No segundo modelo, uma inflamação intestinal crônica era induzida pela transferência de células T $CD45RB^{hi}CD4^+$ colitogênicas para animais Rag (Recobination-activating gene) deficientes ou que apresentam imunodeficiência severa combinada (SCID), ambos linfopênicos. Essa inflamação só era revertida quando células Treg foram co-transferidas para estes animais (POWRIE *et al*., 1994). Existem ainda evidências que populações de Treg são induzidas por bactérias intestinais (CONG *et al*., 2002) ou por seus produtos, como o polissacarídeo A expresso por *B. fragilis* (MAZMANIAN *et al*., 2008).

A expressão de citocinas reguladoras não é restrita às células Treg, mas a sua indução por microrganismos comensais e a ocorrência de inflamação intestinal em sua ausência, indicam que estas células determinam o limite homeostático entre inflamação e não-inflamação (HOOPER & MACPHERSON, 2010).

O balanço entre as células Treg e as células T $CD4^+$ efetoras na mucosa intestinal também é importante para a homeostasia local. Dependendo das moléculas de sinalização e dos fatores de transcrição ativados, as células T $CD4^+$ podem se diferenciar em células Th1, Th2, Th17 e, as já mencionadas subpopulações de Treg (NEURATH *et al*., 2001). A diferenciação tanto para Th17 quanto para Treg requer TGFβ, apesar da IL-6 produzida por DCs e macrófagos em resposta a moléculas bacterianas como resíduos CpG levar à

diferenciação para o fenótipo Th17. No entanto, o TGFβ pode ainda induzir outro subtipo de células T reguladoras, as ditas Th3 LAP^+. A molécula LAP (Latency-Associated Peptide) é um polipeptídeo associado de forma não-convalente ao domínio amino-terminal do TGFβ, formando um complexo latente com esta citocina na membrana da célula. Apesar da expressão de LAP ter sido em descrita tanto em células $TCD8^+$ quanto células $TCD4^+$ de diversos subtipos, as células classificadas como Th3 possuem um fenótipo específico: $CD4^+CD25^-Foxp3^-LAP^+$. Estas células existem naturalmente nos compartimentos linfóides periféricos e migram para o intestino quando seu antígeno cognato entra pela via oral. Uma vez no intestino secretam TGFβ e ajudam na manutenção de um ambiente tolerogênico não apenas inibindo respostas potencialmente inflamatórias como também favorecendo a ação de outros subtipos de células reguladoras (WEINER *et al*., 2011). Já no cólon, células Treg $Foxp3^+$ podem expressar IL-10 que inibe reciprocamente a diferenciação para o fenótipo Th17 e Th1. No intestino delgado, células Treg $Foxp3^-$ (Tr1) também são estimuladas por IL-6 a expressar IL-10, ajudando na manutenção do equilíbrio. Já as células diferenciadas para um fenótipo Th2 são raramente encontradas no intestino de humanos e animais que não estão infectados por parasitas. Isso provavelmente é resultado da inibição da produção de IL4, necessário para a conversão para o fenótipo Th2, por IFNγ produzido por células Th1 (HOOPER & MACPHERSON, 2010).

A microbiota intestinal normal também influencia a diferenciação de células T $CD4^+$. *Lactobacillus casei Shirota* ou *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272, por exemplo, são capazes de induzir a diferenciação de células T para um fenótipo Th1 via a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas (SHIDA *et al*., 1998; MOHAMADZADEH *et al*., 2005). Já Bactérias filamentosas segmentadas (SFB), que se aderem à mucosa, induzem a diferenciação para o fenótipo Th17 (IVANOV *et al*., 2009). Além disso, células dendríticas $CD8\alpha^-CD11b^-CD11c^+$ presentes na *lamina propria* do intestino delgado expressam constitutivamente a subunidade p40 de IL-12 ou IL-23, citocinas envolvidas na diferenciação para Th1 e Th17 respectivamente, em resposta a fagocitose de microrganismos da flora intestinal normal (BECKER *et al*., 2003). Estes dados reforçam a hipótese que células Th1 e Th17 são necessárias para a eliminação de um pequeno número de microrganismos comensais que penetram a camada de células epiteliais da mucosa intestinal. De fato, Gatreaux e colaboradores (1995) demonstraram um aumento na persistência de bactérias comensais translocadas nas diferentes mucosas de camundongos deficientes em células T.

Outra função-chave das células T presentes na mucosa intestinal é aumentar as funções microbicidas das células fagocíticas frente às infecções oportunistas de bactérias

comensais. Um exemplo é a alça IL2-Th1-IFNγ-DC. Macrófagos e células dendríticas ativados por produtos microbianos expressam IL-2 que ativam a célula Th1. Esta por sua vez produz IFNγ que age sobre macrófagos e células dendríticas aumentando sua ativação e função microbicida. A célula Th17 também possui um papel importante na produção de mecanismos microbicidas, pois secretam IL-22, que induz um aumento na produção de proteínas microbicidas, como as bactericinas, IL-17A e IL17F, que promovem o recrutamento e ativação de neutrófilos, e IL-21 que inibe a geração de células Treg (WEAVER *et al*., 2006).

As interações entre os diferentes subtipos de células T $CD4^+$ são ainda mais complexas, visto que já foi demonstrado que elas não se encontram terminalmente diferenciadas no intestino, podendo haver conversão entre os diferentes fenótipos (LEE *et al*., 2009).

Além do seu papel na diferenciação de células T $CD4^+$, células dendríticas que apresentam antígenos microbianos são capazes de induzir o endereçamento e a diferenciação de células B em células plasmocitóides produtoras de IgA por um mecanismo dependente do ácido retinóico, IL-5 e IL-6 produzido pelas DCs (MORA *et al*., 2006). Uma vez diferenciadas, as células plasmocitóides IgA^+ migram dos tecidos linfóides para a *lamina propria* e iniciam a secreção de IgA. Esta é translocada através do epitélio e, ao atingir o lúmen, protegem contra infecções, inibindo a aderência e bloqueando toxinas de bactérias e neutralizando vírus. Outras funções incluem, por exemplo, a ativação de células através da ligação com os receptores para Fc (HILL & ARTIE, 2010; BEMARK *et al*., 2012). Apesar das funções da IgA serem bem definidas, ainda é difícil demonstrar claramente seu papel crítico na imunidade de mucosas, em geral, pois tanto em modelos experimentais quanto em humanos deficientes para IgA, há um aumento nos níveis de IgM, que são compensatórios (BEMARK *et al*., 2012).

Todos os mecanismos mencionados além de favorecerem o equilíbrio entre a hipo e a responsividade imunológica da mucosa intestinal frente aos microrganismos ali presentes permitem, ainda, que antígenos derivados de alimentos, e que são, portanto, estranhos ao hospedeiro, não iniciem uma resposta inflamatória indesejada. Este fato torna a mucosa intestinal um sítio único e essencial a um fenômeno conhecido como tolerância oral.

1.3.3. Tolerância Oral:

A administração oral de um antígeno apresenta três principais consequências já descritas: primeiro, a secreção local de imunoglobilina A que pode ocorrer na própria mucosa intestinal; segundo, uma resposta imune sistêmica pode ser iniciada, levando a geração de anticorpos séricos e imunidade celular; e finalmente, um estado de tolerância local ou sistêmica pode se desenvolver, prevenindo a indução de uma imunidade potencialmente danosa quando o mesmo antígeno é encontrado em ocasiões subsequentes. As duas primeiras situações compreendem a resposta imune protetora contra patógenos invasores, enquanto proteínas alimentares ou provenientes de bactérias comensais induzem tolerância e não provocam injúrias locais ou resposta imune sistêmica (FARIA & WEINER, 2005).

Dá-se o nome de tolerância oral ao estado de baixa reatividade imunológica sistêmica e específica a um determinado antígeno após a administração do mesmo por via oral (HANSON *et al*., 1977). A primeira descrição desse fenômeno ocorreu ainda em 1911 quando Wells preveniu a anafilaxia sistêmica em cobaias ao alimentá-los previamente com proteínas de ovos de galinha (WEINER *et al*., 1994). Anos mais tarde, em 1946, Chase demonstrou que a administração oral do hapteno DNFB em cobaias suprimia a resposta de sensibilidade por contato. No entanto foi apenas nas décadas de 70-80 que inúmeros trabalhos com o objetivo de elucidar quais os fatores que contribuíam para a indução de tolerância oral foram publicados (MOWAT, 1987).

A tolerância imunológica resultante da administração oral de um antígeno não é programada nas linhagens germinativas, mas é adquirida durante a maturação do sistema imunológico por mecanismos que deletam ou inativam clones antígeno-reativos (WEINER *et al*., 1994). Três mecanismos principais foram descritos e tentam explicar este fenômeno: i. Deleção clonal; ii. Anergia clonal; e iii. Supressão ativa. Diversos fatores foram associados com a determinação do tipo de tolerância periférica que se desenvolve após a administração oral de um antígeno, mas a dose do mesmo parece ser determinante na escolha (WEINER *et al*., 1994).

Doses mais baixas do antígeno são capazes de induzir a diferenciação de diferentes subtipos de células T reguladoras: células Treg induzidas $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$, células Treg naturais $CD25^{+}Foxp3^{+}$, células Tr1 produtoras de IL-10 e células Th3 dependentes de TGFβ. Estas células são responsáveis p ela tolerância periférica via supressão ativa ao induzir a morte dos clones antígeno-específicos (WEINER *et al*., 2011). Uma característica intrínseca

deste mecanismo é a supressão *bystander* que consiste na extensão da supressão da resposta imune contra um determinado antígeno que, apesar de não ser estruturalmente relacionado com aquele que induziu a supressão, é expresso pela mesma célula ou órgão-alvo (MILLER, TURLEY & PODOJIL, 2007). Este processo é reflexo, principalmente, da produção de citocinas anti-inflamatórias como o TGF-β ou IL-10 pelas células T reguladoras (FARIA & WEINER, 2005).

Inúmeros fatores podem afetar a geração de células T reguladoras, como por exemplo, o nível de co-estimulação, o microambiente onde a resposta imune está sendo gerada e a exposição de epítopos que podem favorecer a geração destas células (WEINER *et al*., 1994). No entanto são as células dendríticas que vêm ganhando destaque na indução de células reguladoras no intestino. De fato, as propriedades especiais das células dendríticas $CD103^+$ da mucosa não são compartilhadas por células dendríticas $CD103^+$ DCs de outros tecidos e parecem ser impressas pelo tecido do intestino propriamente dito (SCOTT *et al*., 2011).

O epitélio intestinal promove um fenótipo tolerogênico nas células dendríticas via a produção de linfopoetina tímica estromal (TSLP), TGFβ e ácido retinóico (ILIEV *et al*., 2009a; 2009b). Corroborando esta ideia, Molenaar e colaboradores (2009) descobriram que a capacidade plena das células dendríticas derivadas do intestino na indução do tropismo das células T para o epitélio intestinal requer a cooperação das células estromais não-hematopoiéticas constituintes do linfonodo mesentérico. De fato, comparativamente, as células do estroma deste linfonodo expressam níveis mais elevados de enzimas responsáveis pela produção do ácido retinóico do que as células estromais de linfonodos periféricos. Além disso, mesmo quando linfonodos periféricos são transplantados no intestino ainda são incapazes de induzir a expressão de moléculas de endereçamento para este órgão, tais como $\alpha_4\beta_7$ e CCR9, em células T ali primadas. Essa incapacidade foi relacionada principalmente às diferenças no estroma entre os linfonodos periférico transplantado e o mesentérico ali presente, visto que o primeiro não apenas foi conectado à rede linfática que drena o intestino, como também foi povoado com células linfoides e apresentadoras do antígeno provenientes do intestino (HAMMERSCHMIDT *et al*., 2008). Assim, percebe-se que diferenças específicas do epitélio intestinal contribuem para a indução da tolerância por mecanismos dependentes das células apresentadoras de antígenos. Ainda neste sentido, Quintana e colaboradores (2010) demonstraram que a ligação do receptor aril hidrocarboneto (AHR) com um de seus possíveis ligantes, dado oralmente, induziu células $Foxp3^+$ funcionais por um mecanismo dependente de células dendríticas.

A supressão *bystander* também pode envolver a participação de células dendríticas. Neste caso, células apresentadoras de antígenos agem como uma ponte temporária para a passagem de informações entre células T tolerogênicas (reguladoras) e células T virgens, mesmo que a especificidade antigênica não seja a mesma entre essas duas células T (ALPAN *et al*., 2004). Desta forma, durante o processo, as células T tolerogênicas produzem uma série de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4 que "educam" as células dendríticas. Estas, por sua vez, induzem as células T virgens a produzirem as mesmas citocinas. Este processo parece ser o mecanismo pelo qual as células T $CD8^+$ participam da indução da tolerância oral, visto já foi demonstrado que a co-apresentação de antígenos pela mesma célula dendrítica para $CD4^+$ e $CD8^+$ pode induzir esta última a produzir a mesma classe de resposta da primeira (ALPAN *et al*., 2004).

Apesar dos antígenos alimentares serem degradados ao longo do intestino, já foi demonstrado que após a absorção, certa quantidade desses antígenos, cae na circulação sistêmica (WALKER & ISSELBACHER, 1974; HUSBY, JENSENIUS & SVEHAG, 1985; BRUCE & FERGUSON, 1986). Assim, doses maiores do antígeno administrados oralmente induzem o aumento sistêmico de sua concentração e favorecem a tolerância sistêmica através da deleção ou anergia dos clones antígeno-específicos (WEINER *et al*., 1994).

Embora não esteja claro como ocorre a deleção clonal, parece existir uma estreita relação entre a apoptose e a indução da tolerância oral. Um exemplo é o tratamento de animais normais com altas doses de antígeno por via oral que resulta em uma aumentada taxa de apoptose de linfócitos após o desafio sistêmico com este mesmo antígeno na presença de um adjuvante (GARSIDE *et al*., 1996). Além disso, há evidências que apontam a resistência à apoptose como contribuinte para a perpetuação da doença inflamatória intestinal (IBD - Inflammatory Bowel Disease) (NEURATH *et al*., 2001). Adicionalmente, foi descrito que células T apoptóticas não apenas podem liberar TGF-β diretamente no meio como também a fagocitose dessas células por macrófagos e células dendríticas no intestino inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por essas APCs, que passam a produzir TGF-β. Assim, há a possibilidade de que a deleção clonal das células T presentes na mucosa contribui para a manutenção de um ambiente tolerogênico (FARIA & WEINER, 2005).

A anergia clonal parece ser a base da tolerância periférica a inúmeros antígenos-próprios. Sua participação na indução da tolerância oral foi sugerida por experimentos nos quais a tolerância de célula T pôde ser revertida *in vitro* por IL-2 exógena. A resposividade a IL-2 e a impossibilidade de transferência da supressão foram utilizadas, então, como critério

para a definição da anergia clonal como o principal mecanismo responsável pela tolerância oral a altas doses de antígeno (FARIA & WEINER, 2005). Recentemente, Kriegel e colaboradores (2009) confirmaram os dados anteriores ao demonstraram que a indução de tolerância oral com altas doses do antígeno era inibida em camundongos deficientes em GRAIL, uma ligase superregulada em células anérgicas.

O fato de que células anérgicas podem reter outras funções, como a produção de citocinas, parece ser importante para a sua participação na indução de tolerância oral. Um exemplo é visto em alguns regimes de alimentação que induzem tolerância de células T produtoras de IL-2 *in vivo* e *in vitro* e que aumentam a produção de IL-4 e TGF-β. Como estas citocinas são consideradas mediadoras da tolerância oral, células anérgicas poderiam funcionar como células reguladoras por meio da liberação destas citocinas (FARIA & WEINER, 2005).

Outro mecanismo que parece estar envolvido na anergia clonal também conta com a participação de células dendríticas. Altas doses do antígeno favorecem sua captura por células dendríticas intestinais imaturas que, ao apresentarem esse antígeno às células T virgens,por não disporem de co-estímulos, induzem a anergia destas células (NAGLER-ANDERSON, 2001).

Essa divisão entre dose e mecanismos, no entanto, é contestada por vários trabalhos que mostram supressão ativa em animais tolerizados por altas doses de antígeno (Carvalho & Vaz, 1996). Além disso, há evidências que mostram que os mecanismos envolvidos na indução de tolerância oral não são mutuamente excludentes e podem se sobrepor (WEINER *et al*., 1994).

Independente do tipo de mecanismo tolerogênico, os sítios onde essa resposta é induzida parece ser extremamente importante no processo, visto que os linfonodos mesentéricos são necessários e suficientes (na ausência das Placas de Peyer) na indução da tolerância oral (IWASAKI, 2007). Worbs e colaboradores (2006) demonstraram que apesar do processo de tolerância oral iniciar-se na *lamina propria* intestinal, havia a necessidade do transporte do antígeno via célula dendrítica deste local para o linfonodo mesentérico. Esta necessidade foi vista quando camundongos deficientes em CCR7, cujas células dendríticas, portanto, não conseguem migrar para os linfonodos mesentéricos, não desenvolviam tolerância oral. Além disso, demonstraram que a conexão linfática entre a *lamina propria* e o linfonodo mesentérico também era importante para a tolerância oral. Este trabalho forneceu evidências críticas de que a tolerância induzida pela administração oral dos antígenos depende

da capacidade migratória das células dendríticas. Finalmente, demonstra ainda, que essas células não são suficientes para gerar tolerância *in situ* nos folículos linfoides, mesmo que os antígenos orais entrem rapidamente nestes sítios.

A principal característica da tolerância oral é seu efeito sistêmico, no entanto, a transposição entre a indução da tolerância na mucosa intestinal e a efetuação de uma resposta reguladora na periferia ainda não está completamente entendido. Um dos fatores que poderiam explicar tal conexão é que antígenos administrados por via oral podem se disseminar sistemicamente pelo sangue ou pela linfa. Conforme mencionado anteriormente, as proteínas alimentares podem ser detectadas no sangue de animais e humanos logo após sua ingestão (WALKER & ISSELBACHER, 1974; HUSBY, JENSENIUS & SVEHAG, 1985). Este processo induz a expressão simultânea de marcadores de ativação, como por exemplo, CD69 (SMITH, DAVIDSON & GARSIDE, 2002), e mudanças comportamentais nas células T, como a formação de agregados (ZINSELMEYER *et al*., 2005), nos linfonodos mesentéricos e periféricos. Além disso, Peng e colaboradores (1990) demonstraram que o soro de camundongos alimentados com ovalbumina era capaz de induzir um quadro de tolerância antígeno-específica em receptores não tolerizados.

Além da disseminação sistêmica do antígeno ingerido pela via oral, a participação do fígado parece ser importante na amplificação da tolerância oral. Um dos dados que sugerem tal relação é o fato de que a interrupção da passagem do sangue pela veia porta, responsável pela drenagem do sangue do intestino para o fígado, inibe a indução da tolerância oral (YANG *et al*., 1994). Safadi e colaboradores (2005) mostraram ainda que a indução da tolerância oral era aumentada em camundongos transformados para expressar IL-10 especificamente nos hepatócitos do que quando comparada a induzida em camundongos selvagens que receberam doses de IL-10 sistêmica. Combinado a isto, as células endoteliais sinusoidais hepáticas captam antígenos circulantes de forma eficiente e podem atuar como células apresentadoras de antígeno. De fato, tais células parecem induzir preferencialmente um quadro de tolerância, baseado em células $TCD8^+$ reguladoras, do que um quadro inflamatório (LIMMER *et al*., 2005). As células de Kupffer e células dendríticas hepáticas também são mais tolerogênicas do que as células apresentadoras de antígeno periféricas (THOMSON & KNOLLE, 2010). Finalmente, Goubier e colaboradores (2008) demonstraram que as células dendríticas plasmocitóides, além de serem particularmente abundantes no fígado, são importantes na indução da tolerância sistêmica a proteínas e haptenos administrados oralmente, sugerindo mais uma vez o papel do fígado na tolerância oral.

A necessidade da participação da microbiota para a indução da tolerância oral ainda é controversa. Enquanto Walton e colaboradores (2006) mostraram que não havia alteração na tolerância oral mediada por células T em camundongos *germ free* induzida tanto com altas ou quanto com baixas doses de ovalbumina, Tsuda e colaboradores (2010) descreveram que as bactérias comensais promovem um estado de hiporresponsividade nas células T e regulam negativamente a produção de anticorpos no soro induzidos por antígenos da dieta. Corroborando esse dado, Lambert e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento prévio com o antibiótico eritromicina inibe a tolerância oral em camundongos SPF (Specific Pathogen Free). Esta inibição foi associada à redução não apenas da população de *Lactobacillus* da flora endógena, como também, na frequência de células $CD11c^{+}CD11b^{+}CD8\alpha^{+}$ nos linfonodos mesentéricos destes animais.

Além daqueles descritos, diversos outros fatores podem modular a tolerância oral, por exemplo, as células Tγδ. Apesar de se desconhecer o mecanismo pela qual atuam, Ke e colaboradores (1997) demonstraram que camundongos deficientes para a cadeia δ do TCR não montavam tolerância oral. Outro fator que parece modular este fenômeno é a própria composição bioquímica da proteína antigênica. Antígenos administrados oralmente estão sujeitos a inúmeros fatores fisiológicos (como baixo pH, pepsinas, tripsinas e ácido biliar) que podem alterar drasticamente suas propriedades químicas. Este pré-processamento dos antígenos no lúmen intestinal pode alterar sua antigenicidade. Ainda nesta linha, foi visto que a cationização dos antígenos pode inibir a indução da tolerância oral (DOMEN *et al*., 1987).

Foi descrito ainda que as células epiteliais intestinais expressam toda a maquinaria molecular necessária ao processamento e apresentação antigênica, incluindo catepsinas proteolicamente ativas, cadeia invariante e moléculas de MHC de classe II (HERSHEBERG & MAYER, 2000). Estudos *in vitro* mostraram que essas células, apesar de serem menos potentes que as células apresentadoras de antígeno profissional, são capazes de processar e apresentar antígenos por esta via, embora não expressem moléculas co-estimuladoras, em condições fisiológicas (BLAND & WARREN, 1986). Essa apresentação, na ausência de co-estimulação, também poderia influenciar na promoção de tolerância local e sistêmica. Os peptídeos associados à molécula de MHC de classe II produzido pelos enterócitos podem ser ainda empacotados em exossomos que, por sua vez, podem se destacar do pólo basal dos enterócitos. Esses tipos de exossomos, chamados de tolerossomos, parecem participar da geração de um ambiente tolerogênico no intestino. Essas estruturas foram identificadas em 2001 por Karlsson e colaboradores no soro de animais submetidos à indução de tolerância oral. A retirada, por ultracentrifugação, dessas estruturas do soro dos animais tolerizados

inibiu a transferência adotiva da tolerância antes obtida pela transferência do soro total. Com base nestes dados, foi sugerida a participação efetiva do epitélio intestinal no processo de indução da tolerância oral. A estrutura exata dos tolerossomos ainda é desconhecida, mas supõe-se que contenham moléculas co-estimuladoras que favoreçam a indução da tolerância ao antígeno apresentado por ele (MIRON & CRISTEA, 2012).

Virtualmente todas as manifestações imunológicas específicas podem ser suprimidas pelos diferentes regimes de administração oral do antígeno. Contudo, há uma clara hierarquia de inibição após a indução de tolerância oral. Reações de Hipersensibilidade Tardia (DTH – Delayed-Type Hypersensitivity) e inflamação do tipo Th1 são mais facilmente suprimidas pela administração oral do antígeno do que a fomação de anticorpos dependente de Th2. Em geral, a inibição de respostas do tipo Th2 requer doses mais altas de antígenos ou em maior frequência. A exceção é a resposta por imunoglobulina E dependente de IL-4, que é altamente suscetível à indução de tolerância oral (FARIA & WEINER, 2005).

1.3.4. Probióticos:

O conceito de probiótico surgiu pela primeira vez quando Döderlein sugeriu que bactérias produtoras de ácido lático inibiam o crescimento de patógenos (citado por Holzapfel *et al*., 2001). Ainda no início do século XX, Elie Mecknikov observou que o consumo regular de bactérias lácticas em produtos fermentados era associado com a melhora na saúde e na longevidade de camponeses búlgaros (citado por Anukan & Reid, 2007). Desde então inúmeros trabalhos têm demonstrado os benefícios da ingestão de probióticos em síndromes alérgicas e outras condições inflamatórias. Atualmente a Organização Mundial da Saúde em conjunto com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (WHO/FAO) definem como probióticos "microrganismos vivos, os quais, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (WHO, 2001). Em termos gerais os microrganismos devem preencher alguns critérios para serem reconhecidos como probióticos (Fuller, 1991; Fuller, 1992), entre eles:

1. Oferecer benefícios à saúde do hospedeiro, abrangendo aqui a capacidade de impedir a ligação de patógenos às células epiteliais do intestino ou possuir toxicidade direta a bactérias, vírus ou fungos prejudiciais ao hospedeiro; Adicionado ao fato de ser seguro para o consumo.

2. Ser capaz de ser preparado de maneira viável e em larga escala;

3. Manter-se estável e viável durante o uso ou quando estocado;

4. Ser capaz de sobreviver no ecossistema intestinal por tempo suficiente para exercer seu efeito benéfico.

Em termos taxonômicos, as bactérias mais comumente utilizadas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, isoladas do próprio trato gastro-intestinal humano. No entanto, inúmeros trabalhos têm mostrado que outras bactérias lácticas como a *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* e bactérias não lácticas como *Propionibacterium freudenreichii* e a gram-negativa *Escherichia coli* Nissle 1917 também podem ser consideradas probióticas (ROUND & MAZMANIAN, 2009).

Os efeitos benéficos probióticos podem ser divididos em três tipos, de acordo com a sua natureza: i. Microbiológicos, ii. Epiteliais e iii. Imunológicos (TOH *et al*., 2012).

Os efeitos benéficos ditos de natureza microbiológica dos probióticos se revelam, por exemplo, nas modificações do microambiente do lúmen intestinal, tais como, diminuição do pH local e competição por nutrientes que resultam, em última instância, em condições restritas ao crescimento de bactérias patogênicas (TODOROV *et al*., 2011). De fato, algumas cepas de lactobacillus produzem ácido láctico, acético e propiônico que diminuem o pH local, levando a inibição do crescimento de várias espécies de bactérias patogênicas Gram-negativas. Como exemplo pode-se citar a inibição do crescimento de *Salmonella enterica* unicamente pela ação local do ácido láctico produzido pelos lactobacillus (MAKROS *et al*., 2006).

A competição pela interação com o epitélio intestinal também parece ser um fator determinante no controle da microbiota pelos probióticos. Isso porque a interação das bactérias tanto da microbiota normal, quanto daquelas probióticas ou patogênicas com a mucosa intestinal humana é baseada em um equilíbrio dinâmico. Inicialmente, ocorre uma fraca associação entre a bactéria e a superfície epitelial, onde ligações hidrofóbicas e eletrostáticas predominam. Posteriormente, interações mais específicas ocorrem entre determinantes moleculares na superfície da bactéria, como ácido lipoteióico, lectinas e adesinas, e moléculas expressas pela mucosa, como colágeno dos tipos I e IV, fibronectina e laminina, fixando a bactéria no local. Desta forma, os probióticos podem competir com outros microrganismos pela ligação a receptores específicos nas células epiteliais do hospedeiro, prevenindo uma potencial invasão pelo microrganismo patogênico. De acordo com Aleljung e

colaboradores (1994), a molécula necessária para interação tanto do *Lactobacillus plantarum* quanto para o *L. reuteri* NCIBI1951 com o epitélio é uma proteína ligante de colágeno do tipo I cuja sequência tem alta homologia com o fator de interação expresso por uma cepa patogênica de *E. coli*, sugerindo que os três microrganismos utilizam o mesmo receptor em sua interação com o epitélio. Da mesma forma, proteínas de superfície presentes em *L. crispatus* e *L. helveticus* foram capazes de prevenir a adesão da *Escherichia coli* O157:H7, cepa patogênica, em células das linhagens Hela, HEp-2 e T84 (JOHNSON-HENRY *et al*., 2007; CHEN *et al*., 2007).

As bactérias probióticas são capazes de produzir as ditas moléculas de interferência, ou bactericinas, proteínas sintetizadas pela via ribossomal (ou seja, não são apenas metabolitos secundários) e que interferem no crescimento de outras espécies de bactérias (MONTALBÁN-LÓPEZ *et al*., 2011). As bacteriocinas são produzidas no fim da fase de crescimento exponencial e seu espectro de ação pode variar dependendo da cepa em questão (PESSIONE, 2012). Podem ser de diferentes tipos, e são classificadas de acordo com a sua natureza bioquímica. As bacteriocinas de classe I são conhecidas como lantibióticos por conter aminoácidos modificados pós-traducionalmente (como lantionina, β-metil-lantionina e dehidroalanina). São peptídeos pequenos (formados por 19-38 aminoácidos) e subdivididos em duas subclasses, de acordo com sua estrutura e modo de ação. Os lantibióticos catiônicos anfifílicos alongados, produzidos por cepas de *Lactococcus lactis* – lactococcinas –, por exemplo, agem formando poros nas células-alvo, levando a dissipação do potencial de membrana e efluxo de pequenos metabólitos. Já os lantibióticos globulares (como a mersadicina) agem através da inibição enzimática, interferindo diretamente na biossíntese da parede celular (PESSIONE, 2012; MORGAN *et al*., 2005). As bacteriocinas de classe II são peptídeos pequenos (<10kDa), sem muitas modificações pós-traducionais e cujo espectro de ação é bastante estreito, agindo basicamente contra bactérias Gram-positivas como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphilococcus*, *Listeria* e *Mycobacteria*, embora algumas cepas de *Bifidobacteria* produzam bacteriocinas de classe II eficientes contra bactérias Gram-negativas também (COLLADO *et al*., 2005). Finalmente, as bacteriolisinas são proteínas anti-microbianas cuja ação se baseia na lise de células sensíveis por catalisar a hidrólise da parede celular. Sua estrutura contém um domínio amino-terminal homólogo a endopeptidases e um domínio C-terminal de reconhecimento da célula-alvo (LAI *et al*., 2002).

A natureza epitelial dos efeitos benéficos dos probióticos está relacionada à proteção da barreira intestinal e das células que a compõem, principalmente através da regulação da função e expressão de proteínas da junção oclusiva e da secreção de muco (CABALLERO-FRANCO *et al*., 2007). Zyrek e colaboradores (2007) demonstraram que a cepa probiótica *E.*

coli Nissle 1917 promove a formação de junções oclusivas após o rompimento da monocamada de células epiteliais células T84 por uma cepa de *E. coli* enteropatogênica. De acordo com os autores, essa proteção probiótico-dependente parece ter sido mediada pela indução da superexpressão e da redistribuição de proteínas como ZO-2 e proteína quinase C (PKC) ζ na superfície celular, restaurando o complexo juncional.

Além da barreira física, o epitélio intestinal também regula ativamente o microambiente local através da produção de substâncias citoprotetoras, ou seja, proteínas choque-té rmico induzidas em situações de estresse e que ajudam na manutenção da homeostasia intestinal e na defesa contra injúrias (LIU *et al*., 2003). De acordo com Tao e colaboradores (2006), fatores solúveis presentes na cultura de *Lactobacillus GG* são capazes de induzir a síntese de Hsp25 e Hsp72 por células epiteliais de maneira dependente de p38 e JNK/MAPK, favorecendo a sobrevivências destas células. Outro mecanismo em potencial é a prevenção do dano tecidual induzido por citocinas inflamatórias pela inibição da apoptose em células epiteliais. O próprio *Lactobacillus GG* foi capaz de prevenir a apoptose induzida por citocinas tanto em células epiteliais murinas quanto humanas através da ativação de Akt (anti-apoptótico), de maneira PI3K-dependente e inibindo a ativação de p38/MAPK (pró-apotótico) (YAN *et al*., 2002).

Finalmente, os probióticos produzem, após a fermentação de fibras alimentares, ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), tais como butirato, acetato e propionato. Estas moléculas são capazes de exercer atividades anti-inflamatórias e de proteção da barreira (TOH *et al*., 2012). O butirato, em especial, parece ter um papel muito importante no controle de neoplasias no cólon. Iacomino e colaboradores (2001) demonstraram, por exemplo, que o butirato afeta de maneira distinta colonócitos normais e células do cólon tumorais. Enquanto que sobre os primeiros exerce uma ação trófica, induzindo o crescimento e proliferação, na segunda induz a parada no ciclo celular, diferenciação e apoptose. Além disso, Sauer e colaboradores (2007) mostraram que o butirato pode controlar o estresse oxidativo e metabólico, aumentando a resposta reparadora nas células epiteliais.

O acetato, por sua vez, foi relacionado à diminuição de lesões inflamatórias em modelos de asma e colite (TOH *et al*., 2012). Fukuda e colaboradores (2011) demonstraram ainda que algumas cepas de bifidobactérias são capazes de proteger o camundongo contra a morte induzida pela infecção por *E. coli* O157:H7. Esta proteção era baseada na produção de grandes quantidades de acetato que, por sua vez, agia sobre as células epiteliais induzindo citocinas pró-inflamatórias, como TNFα, e principalmente, proteínas anti-apoptóticas que

favoreciam a sobrevivências dessas células. Isso resultou no bloqueio da translocação letal da bactéria patogênica para o sangue. Da mesma forma que outros componentes produzidos por bactérias probióticas, os SFCAs ainda podem induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias por modularem a atividade do NFκB (TEDELIND *et al*., 2007).

Finalmente, as bactérias são capazes de modular a imunidade inata e adaptativa, favorecendo tanto respostas pró quanto anti-inflamatórias. Por esta capacidade imunomoduladora, os probióticos se mostram uteis na defesa contra patógenos, aumentando a produção de anticorpos na mucosa, de defensinas e de citocinas pró-inflamatórias; Mas também se mostram necessários no controle de quadros inflamatórios sistêmicos por meio da indução de citocinas anti-inflamatórias e diferenciação das células imunes para um perfil regulador (SAULNIER *et al*., 2009). Deve-se ressaltar, no entanto, que tais efeitos aparentemente antagônicos são, na verdade, resultado da ação de microrganismos distintos, ou seja, a modulação entre um ambiente pró ou anti-inflamatório é cepa e dose-dependente (GALDEANO & PERDIGON, 2004).

A modulação da imunidade da mucosa intestinal por espécies de *Lactobacillus*, por exemplo, induz a migração de células B e a produção de IgA (GALDEANO & PERDIGON, 2004). Corroborando este dado, de Moreno de LeBlanc e colaboradores (2008) demonstraram que o consumo prolongado de leite fermentado aumenta a imunidade intestinal mediada por células IgA^+ através da modulação da expressão de receptores do tipo Toll e pela produção de citocinas como IFNɣ, TNF-α, IL-22 e IL-10. Tsai e colaboradores (2008) mostrou que a expressão de CD80, CD86 e MHC de classe II é aumentada em macrófagos e células dendríticas após a administração de *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. O lactobacilo não apenas aumentou a ativação das células apresentadoras de antígeno durante o período de consumo, mas essa ativação ainda persistiu durante um determinado período após o tratamento. Diferentes espécies de *Bifidobacterium* também foram capazes de induzir a maturação de células dendríticas humanas bem como sua habilidade em secretar diferentes citocinas, sugerindo seu potencial em influenciar determinados subtipos de resposta imune. Enquanto a *B. animalis* e *B. longum* induziram a produção de IFNγ e TNFα, que poderiam favorecer uma resposta do tipo Th1, a *B. bifidum* foi capaz de induzir a produção de IL-17 pelas células dendríticas, indicando o possível direcionamento para um fenótipo Th17 com o seu consumo (LÓPEZ *et al*., 2010).

Os benefícios do aumento da ativação imunológica e da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos probióticos foram exemplificados em diversos modelos animais. Foi

mostrado, por exemplo, que *Lactobacillus* são capazes de induzir uma resposta imune adaptativa capaz de proteger o hospedeiro e aliviar os sintomas causados pela infecção por *E. coli* O157:H7 (OGAWA *et al*., 2001). A ingestão de *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 prévia à infecção por *E. coli* O157:H7 diminuiu os efeitos deletérios dessa infecção e levou à ativação da função de células dendríticas e células T além do aumento da produção de anticorpos protetores (TSAI *et al*., 2010). De forma similar, esse efeito protetor também foi demonstrado em humanos: a adição de um iogurte contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, na dieta de crianças infectadas com *Helicobacter pylori* levou a diminuição na carga parasitária com o concomitante aumento na concentração de IgA no soro das mesmas (YANG & SHEU, 2012).

Conforme mencionado, os probióticos também são capazes de induzir um perfil regulador. Já foi demonstrado que probióticos podem modular o fenótipo de células dendríticas para um perfil tolerogênico, produtor de IL-10 (BORCHERS *et al*., 2009). Livingston e colaboradores (2010), ao analisarem o sobrenadante da cultura de células dendríticas pré-tratadas com *Lactobacillus reuteri* 100-23 e células T, constataram uma maior concentração de IL-10 e TGFβ nestas culturas quando comparadas àquelas em que as células dendriticas não tiveram contato prévio com o probiótico. Além disso, os autores mostraram ainda que camundongos livres de *Lactobacillus* quando colonizados com o *Lactobacillus reuteri* 100-23 apresentavam uma maior frequência de células $Foxp3^+$ no baço e linfonodo mesentérico quando comparados aos animais não-colonizados.

A capacidade de induzir células T reguladoras é bastante comum entre as diferentes espécies de probióticos. O *Lactobacillus rhamnosus* GG e o *B. lactis* Bb12 suprimem os sintomas alérgicos em um modelo de asma experimental por induzirem não apenas células reguladoras produtoras de TGFβ nos linfonodos mesentéricos como também por dobrar a frequência de células $Foxp3^+$ nos linfonodos peribronquiolares (FELESZKO *et al*., 2007). Em outro estudo, a incubação prévia de células mononucleares do sangue periférico de humanos saudáveis com o *L. acidophilus* W55 permitiu a indução de células T $Foxp3^+$ a partir de células $CD25^-$ (DE ROOCK *et al*., 2010). Ainda nesta linha, Foligni e colaboradores (2007) demonstraram que células dendríticas derivadas de medula óssea foram capazes de fagocitar *L. rhamnosus* Lr32 quando co-cultivados. A fagocitose induziu a maturação parcial destas células que passaram a ser capazes de proteger os animais da colite induzida por TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico) quando transferidas. A proteção foi associada ao aumento da expressão local da enzima indolamina 2, 3 dioxigenase (IDO) e a indução de células T reguladoras por um mecanismo independente de IL-10.

Os resultados mais surpreendentes, entretanto, foram mostrados por Round e Mazmanian (2010). De acordo com os autores a mono-colonização de camundongos *germ free* com a *B. fragilis* aumentou a capacidade supressora de células T reguladoras e elevou a produção de IL-10 exclusivamente por células T Foxp3^{+} do intestino. Esse efeito foi dependente do polissacarídeo A (PSA) produzido pela bactéria e esta molécula foi suficiente para converter células T CD4+ em células T Foxp3+ produtoras de IL-10 por um mecanismo dependente de TLR2. Finalmente, os autores demonstraram que os efeitos anti-inflamatórios da *B. fragilis* e do PSA foram eficientes tanto na prevenção quanto no tratamento (e cura) de colite experimental em camundongos.

Atualmente, as células do epitélio intestinal são consideradas componentes centrais do sistema imune local. Como tais, também são capazes de reconhecer, interagir e serem moduladas pela microbiota endógena e por microrganismos probióticos. De fato, Pagnini e colaboradores (2010) mostraram que a formulação probiótica VSL#3 (*S. termophlu*s, *B. infantis* e *L. acidophilus*) preveniu a inflamação intestinal em camundongos com ileíte, um dos modelos experimentais da Doença de Crohn. Segundo os autores, a proteção foi associada com a produção de TNF-α e ativação de NF-κB nas células epiteliais, necessários para a reconstituição da barreira epitelial e de seu funcionamento normal. Rimoldi e colaboradores (2005) mostraram que o sobrenadante da cultura de células epiteliais intestinais com bactérias não patogênicas (*Escherichia coli* DH5α, *Lactobacillus plantarum* NCIMB882 e *Bacillus subtilis*) foi capaz de modular a função de células dendríticas derivadas de monócitos humanos. Estas células passaram a secretar IL-10 e recrutar cálulas T do tipo Th2 e T reguladoras.

Os efeitos imunomoduladores dos probióticos são atribuídos, em parte, à sua interação com receptores do tipo Toll. De forma similar às bactérias patogênicas, os probióticos também possuem padrões moleculares que são detectados pelos TLRs, embora, na maioria dos casos, estes organismos não induzam uma inflamação patológica (VANDERPOOL *et al*., 2008). Células T humanas cultivadas com *E. coli* Nissle 1917 expressam mais TLR-2 e -4 (GRABIG *et al*., 2006). Além disso, este probiótico é incapaz de proteger camundongos deficientes para TLR-2 ou -4 da colite induzida por DSS (dextran sulfato de sódio). Da mesma forma, a mistura probiótica VSL#3 não foi capaz de proteger camundongos deficientes em TLR-9 da colite induzida por DSS, embora seus efeitos benéficos tenham sido mantidos em camundongos deficientes em TLR-2 ou -4 (RACHMILEWITZ *et al*., 2004).

Quando se fala do reconhecimento de bactérias probióticas pelos mesmos receptores que reconhecem bactérias patogênicas, a questão é: como uma DC ou mesmo o epitélio,

diferencia o que é patogênico do que não é patogênico se usam o mesmo receptor? De acordo com Vanderpool e colaboradores (2008) uma explicação possível é que as bactérias probióticas podem conter modificações específicas nos ligantes desses receptores que os ativam de forma distinta de uma bactéria patogênica. De fato, embora não tenham deixado claras as diferenças estruturais entre o LPS de bactérias patogênicas e não-patogênicas, Hajjar e colaboradores (2002) demonstraram que ambas são reconhecidas de forma diferente pelo TLR-4 e que apenas a bactéria patogênica foi capaz de induzir um quadro inflamatório. A ativação do TLR-2 pela lipoproteína da *Legionella* induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF-α, além da expressão de moléculas co-estimuladoras em macrófagos intraperitoneais (SHIM *et al*., 2011). No entanto, como mencionado anteriormente, o reconhecimento do PSA produzido pela *B. fragilis* pelo TLR-2, induz uma subpopulação de células T Foxp3^{+} produtora de IL-10, capaz de proteger contra a colite (ROUND & MAZMANIAN, 2010).

Além da ativação de receptores do tipo Toll, mas relacionado a ela, a interferência na ativação do fator de transcrição NF-κB pelos probióticos também parece ser de extrema importância para os seus efeitos imunomoduladores. A família dos fatores de transcrição NF-κB regula a expressão de centenas de genes que estão associados a diversos processos celulares, como proliferação e morte, bem como as respostas imunes inatas e adquiridas (RAHMAN & MCFADDEN, 2011). As proteínas NF-κB são finamente controladas tanto no citosol, onde são mantidas na forma inativa pela sua interação com as proteínas inibidoras de NF-κB (IκB), quanto no núcleo, onde exercem sua função. De acordo com inúmeros trabalhos as bactérias probióticas são capazes de interferir, positiva ou negativamente em diferentes pontos da via de sinalização dessa molécula. Bactérias *L. reuteri* foi capaz de bloquear a translocação do NF-κB para o núcleo em células HeLa (MA *et al*., 2004). Peptídeos solúveis da mistura VSL#3 foram capazes de inibir a degradação de IκB, prevenindo a ativação do NF-κB (PETROF *et al*., 2004). Da mesma forma, Heuvelin e colaboradores (2009) demonstraram que fatores solúveis da *B. breve* inibiram a secreção de CXCL8 por células HT-29 também por diminuir a fosforilação de IκB, inibindo assim a ativação do NF-κB.

Os efeitos dos probióticos sobre o sistema imune sugerem o seu potencial não apenas na prevenção e no tratamento de síndromes inflamatórias como colite, doença de Crohn e alergias, mas também, como adjuvantes na indução de respostas tanto pró-inflamatórias quanto reguladoras.

1.4. Doença enxerto contra hospedeiro, tolerância oral e probióticos: juntando as peças...

A doença enxerto contra hospedeiro representa hoje o maior obstáculo para o sucesso do TCTH alogeneico. De fato, não há atualmente, um tratamento efetivo para tal fim visto que a maioria deles é direcionada contra as células T alorreativas. Glicocorticóides, FK506, ciclosporina A e mofetil micofenolato melhoram a DECH por mecanismos imunossupressores (TABBARA *et al*., 2002). A depleção de células T por diversos meios reduzem a DECH por limitarem o número de células T alorreativas infundidas no receptor (CAVAZZANA-CALVO *et al*., 2002). No entanto, as terapias farmacológicas e a depleção de células T são insuficientes no controle da DECH e estão associadas a graves efeitos colaterais e toxicidade, com altas taxas de mortalidade resultantes de infecções oportunistas ou na recaída da doença de base. O tratamento dos pacientes com antagonistas de citocinas, de modo a reduzir o dano causado por elas na DECH também foi proposto como uma possível terapia no controle da DECH. Mais uma vez, porém, o tratamento foi associado ao risco aumentado de infecções oportunistas (MESSINA *et al*., 2008). Uma solução plausível seria a indução de tolerancia oral levando a uma tolerância antígeno-específica das células T alorreativas enquanto se mantém a viabilidade do sistema imunológico como um todo.

Baseados nesta ideia, Nagler e colaboradores (2003) investigaram o efeito da indução da tolerância oral no desenvolvimento da DECH crônica em um modelo de TCTH semi-alogeneico. A DECHc foi gerada pela infusão de esplenócitos de animais C57Bl/6 em animais F1(C57Bl/6 X BALB/c) previamente irradiados letalmente. A tolerância oral foi induzida pelo tratamento das quimeras com cinco doses administradas oralmente de esplenócitos provenientes de animais F1 em dias alternados. Os autores observaram uma melhora nas manifestações clínicas e patológicas da DECH no fígado, intestino delgado e pele.

A relação entre microrganismos e o desenvolvimento da DECH já foi proposta em modelos animais há mais de 40 anos (VAN BEKKUM *et al*., 1974) e confirmada mais tarde em humanos (VOSSEN *et al*., 1990). De acordo com a hipótese criada por Hill e colaboradores (1997), o dano no epitélio intestinal causado pelo regime de condicionamento leva a exposição de antígenos da microbiota que, em última instância, resulta na formação de um ambiente propício para a ativação de células T provenientes do doador. Com estes resultados em mente, a descontaminação intestinal com a utilização de antibióticos, se tornou uma prática comum em pacientes que passarão por um transplante de células-tronco hematopoéticas (VOSSEN *et al*., 1990; STORB *et al*., 1983). Esta prática é ainda mais comum em situações em que há um risco aumentado para a ocorrência da DECH: ou seja,

quando o transplante é realizado entre indivíduos aparentados, porém, não totalmente histocompatíveis ou entre indivíduos histocompatíveis não-aparentados (BJORKLUND *et al*., 2007). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que a relação entre a presença da microbiota e o desenvolvimento da doença enxerto contra hospedeiro pode não ser tão direta como prevista. Jenq e colaboradores (2012), por exemplo, demonstraram que após o transplante de medula óssea há uma drástica redução na diversidade da microbiota em camundongos que desenvolveram DECH quando comparados a aqueles que não desenvolveram a doença. Essa redução foi marcada pelo aumento de membros da ordem Lactobacullales, em especial da bactéria comensal *Lactobacillus johnsonii*, e pela diminuição dos membros da ordem Clostridiales e do filo Firmicutes. Ao tentarem determinar o envolvimento do *L. johnsonii* na manifestação da DECH, os autores pré-trataram os animais receptores com antibióticos e depois os recolonizaram ou não com a bactéria em questão. Os receptores tratados com antibiótico apresentaram não apenas uma perda mais acentuada de Clostridiales e aumento de *Enterococcus* spp., como também a doença enxerto contra hospedeiro foi mais grave nestes animais. Em contraste, aqueles animais recolonizados com o *L. johnsonii* após o tratamento com antibiótico, não apresentaram a expansão de *Enterococcus* spp. e foram protegidos da forma mais grave da DECH, antes observada. A grande questão levantada por este trabalho é que os autores, ao analisarem amostras de fezes de pacientes com DECH, encontraram o mesmo padrão de modificação da flora observado anteriormente nos modelos experimentais da doença. Esse achado sugere que a exposição de pacientes a antibióticos antes do transplante pode ser um fator de risco associado a uma forma mais grave da doença. Uma ideia que começa a surgir atualmente é que a simples modificação da flora pode ser mais eficaz do que a descontaminação do paciente no controle da DECH.

Os microrganismos probióticos são aplicados atualmente na clínica, para o tratamento de infecções gastrointestinais, inflamações intestinais crônicas e doenças alérgicas além de serem utilizados como adjuvantes na vacinação. Baseados nestes dados e no fato do intestino ser um dos principais tecidos alvo da DECH, Gerbitz e colaboradores (2004) demonstraram que o tratamento oral do receptor com *Lactobacillus rhamnosus* GG por sete dias antes e sete dias após o transplante reduziu as manifestações clínicas da DECH aguda em um modelo semi-alogeneico. De fato, o tratamento levou a uma redução na ativação de células T $CD3^+$, na redução da translocação bacteriana após o regime de condicionamento e no aumento da sobrevida das quimeras.

Ambas as terapias mencionadas, administração oral do antígeno e uso de probióticos (NAGLER *et al*., 2003; GERBITZ *et al*., 2004) apresentam como vantagem o fato de não

apresentarem efeitos colaterais associados. No entanto, por se basearem no tratamento do receptor do enxerto hematopoiético, a transposição desses protocolos para a clínica é inviável, uma vez que os pacientes que passam pelo TCTH apresentam complicações gastrointestinais advindas do regime de condicionamento, tais como diarréia, vômito e até anorexia, que se prolongam durante algum tempo após o término do tratamento (MALONE *et al*., 2007). Além disso, por causa do seu estado imunossuprimido, encontram-se sob rígido controle alimentar, dificultando qualquer tratamento de tolerização oral ou com bactérias probióticas.

Dessa forma, uma terapia que agisse sobre o doador de forma que a doação fosse feita com células já tolerizadas ao receptor seria de grande valia. Para este fim, o presente trabalho busca unir a indução de tolerância oral com antígenos do receptor e o efeito imunomodulador dos probióticos, como um potencial adjuvante, nos doadores e avaliar o efeito dessa terapia combinada no desenvolvimento da DECH aguda nos receptores.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo Principal:

Gerar um protocolo de tolerância induzido por via oral a fim de minimizar a Doença Enxerto contra Hospedeiro aguda experimental de forma específica

2.1. Objetivos específicos:

- Avaliar a ocorrência clínica de DECH aguda em quimeras enxertados com células de baço provenientes de doadores pré-tratados com a terapia combinada de indução de tolerância oral e tratamento probiótico;

- Avaliar a ocorrência de DECH aguda nos órgãos-alvo da doença em quimeras enxertados com células de baço provenientes de doadores pré-tratados com a terapia combinada;

- Definir se a proteção induzida pelo tratamento do doador com a terapia combinada é antígeno-específica;

- Avaliar a resposta anti-leucemia em quimeras enxertados com células de baço provenientes de doadores pré-tratados com a terapia combinada;

- Determinar o mecanismo envolvido na proteção contra a DECH aguda em quimeras enxertadas com células de baço provenientes de doadores pré-tratados com a terapia combinada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. Animais:

Camundongos isogênicos machos das linhagens C57Bl/6 (H-2^b) ou F1 (C57Bl/6 X BALB/c – H-2^{bd}) com idade variando entre 8 a 10 semanas foram utilizados como doadores de células hematopoiéticas e esplênicas nos experimentos de indução de Doença Enxerto contra Hospedeiro. Adicionalmente, quando mencionado, camundongos C57Bl/c deficientes na produção de interleucina 10 (IL-10 *knockouts*) foram utilizados como doadores de células $CD19^+$. Como receptores em todos os transplantes foram utilizadas fêmeas de F1 com idade entre 12 a 14 semanas. Para os transplantes de pele, camundongos das linhagens BALB/c (H-2^d), B10.A (H-2^a) e F1 (C57Bl/6 X BALB/c – H-2^{bd}) com idade variando entre 10 a 12 semanas foram utilizados como doadores. Todos os animais foram obtidos no biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (Rio de Janeiro, Brasil), mantidos em micro isoladores esterilizados, sob as mesmas condições ambientais. Todos os procedimentos foram realizados em acordo com as normas institucionais de boas práticas para a manipulação de animais de experimentação.

3.2. Cultivo do *Lactococcus lactis* ssp *lactis*:

A cepa bacteriana NCDO2118 de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (*L. lactis*) foi obtida no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para o cultivo da *L. lactis* foi utilizado o meio M17 (Difco, BD Biosciences) liquido suplementado com 0,5% de glicose (GM17). As bactérias foram crescidas a 30°C sem agitação por 24h. Uma vez que a densidade ótica a 600nm (OD_{600nm}) tenha atingido o valor de 2.0 (aproximadamente 1.6 x 10^9 células/mL), foi realizado um inoculo em 25mL de meio M17 suplementado com 0,5% de glicose (5µL de bactérias em 25 mL de meio) e ofertado a um grupo de 5 animais (média de 5mL de meio/animal). Este procedimento foi repetido diariamente durante o tratamento.

3.3. Extrato de proteínas do receptor:

Para o preparo do extrato de proteínas do receptor, 15 a 20 camundongos F1 (C57Bl/6XBALB/c), machos ou fêmeas, foram sacrificados em câmara de CO_2 e tiveram seus baços recolhidos. As células esplênicas foram dissociadas mecanicamente em placas de cultura (TPP, Suíça) contendo PBS (Phosphate-Buffered Saline - NaH_2PO_4 anidro 1,9mM;

Na_2HPO_4 anidro 8,1mM; NaCl 154mM; pH 7,4) gelado, passadas em filtro com poros de 0,4µM e submetidas ao processo de lise das hemácias por ACK (NH_4Cl 0,15M; $KHCO_3$ 10mM; Na_2EDTA 0,1mM; pH 7,2-7,4). Para tanto, a suspensão de células foi centrifugada a 450G por 5 minutos, o sobrenadante descartado e adicionado 1mL de ACK para cada 10^8 células. Após 1 minuto de agitação foram adicionados 10 volumes de PBS e a suspensão foi centrifugada novamente a 450g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2mL de PBS gelado. A suspensão celular, agora livre de hemácias, foi submetida ao processo de lise celular total que compreendeu 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em água fervente. Findo os ciclos, a solução foi fervida por 15 minutos para inativação das proteases. Finalmente, a fração solúvel foi obtida após a centrifugação do material lisado a 1000g por 30 minutos a 4ºC. A quantificação das proteínas totais foi realizada através do *kit* DC Protein Assay (BioRad®), segundo o protocolo descrito pelo fabricante.

3.4. Tratamento do doador com a Terapia Combinada:

Doadores C57Bl/6 receberam, por gavagem, 50µg de extrato proteico de células esplênicas de animais F1 (C57BL/6 x BALB/c) por cinco dias concomitante a administração *ad libitum* de *Lactococcus lactis* ssp *lactis*. Quatro dias após o término do tratamento oral, os animais foram imunizados com uma injeção intraperitoneal de 10^6 células de baço de animais F1 para reforçar o fenótipo tolerante (RUSSO *et al.*, 2001). O transplante de medula óssea foi realizado seis dias após a imunização (Figura 3.1). Quando indicado, animais tratados apenas com o extrato proteico ou que receberam apenas a bactéria foram utilizados como controles.

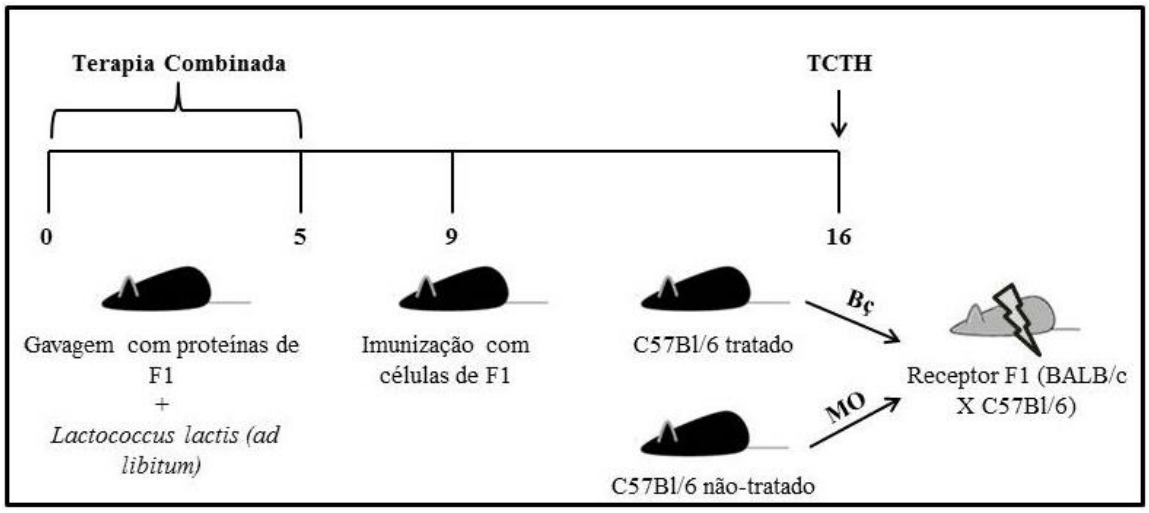

Figura 3.1: Esquema do tratamento do doador com a terapia combinada e do transplante de medula óssea.

3.5. Transplante de medula óssea (TMO):

3.5.1. Irradiação:

Para a realização dos transplantes de medula óssea, os animais receptores (F1 BALB/c X C57BL/6) foram submetidos a irradiação corpórea total de 950 cGy, para a depleção do sistema hematopoiético. A irradiação foi realizada no aparelho TH780C (Theratronics, Canada), que utiliza uma fonte irradiadora de cobalto 60 (60Co), em dose única, aplicada metade em campo superior (dorso) e metade em campo inferior (abdômen). Durante a irradiação os animais foram contidos em caixas de acrílico apropriadas. Após este procedimento, os animais foram mantidos em ambiente estéril.

3.5.2. Reconstituição hematopoiética:

A reconstituição hematopoiética foi realizada 24h após a irradiação e consistiu na infusão endovenosa de $5X10^6$ células de medula óssea proveniente de um doador em conjunto com células totais de baço normalizadas para $5X10^6$ de células T $CD3^+$. As células da medula óssea foram obtidas a partir do fêmur e tíbia dos doadores, cortando-se as epífises e lavando o interior com PBS suplementado com 10% de SFB. Em seguida a suspensão de células foi homogeneizada, passada em filtro com poros de 0,4µM e mantidas no gelo até o momento do transplante. Já para a obtenção das células esplênicas, o baço dos animais doadores foi macerado em placas de cultura (TPP, Suíça) contendo PBS suplementado com 10% de SFB, a fim de se obter uma suspensão de células que, em seguida, foi passada em filtro com poros de 0,4µm. As hemácias das preparações esplênicas foram lisadas utilizando-se solução de ACK, de acordo com o descrito no item 3.3. Após esse procedimento, as células foram ressuspensas em PBS suplementado com 10% de SFB e mantidas no gelo até o momento do transplante. Uma amostra da suspensão final das células esplênicas foi recolhida e utilizada para a determinação da frequência de células T $CD3^+$ por citometria de fluxo. No grupo controle negativo de doença (Ctr-) foi realizado um transplante singeneico, onde o doador da medula óssea e das células esplênicas é também um camundongo da linhagem F1. Já nos grupos experimental e controle positivo de doença, foi realizado um transplante semi-alogeneico, onde o doador da medula óssea é um camundongo da linhagem C57Bl/6. A diferença entre estes dois últimos grupos recai na fonte das células esplênicas: enquanto no primeiro grupo as células provieram de doadores C57BL/6 tratados com a terapia combinada (grupo experimental AgF1/Ll), no segundo, o doador não é tratado (grupo controle positivo de

doença – Ctr+). Quando indicado, os baços foram previamente depletados de células T reguladoras ($CD25^+$), células B ($CD19^+$) ou células LAP^+.

3.5.3. Avaliação do desenvolvimento da DECH aguda:

O desenvolvimento da doença enxerto contra hospedeiro foi acompanhada de duas formas: avaliação dos sinais clínicos característicos e avaliação histopatológica dos órgãos afetados.

3.5.4. Avaliação do escore clínico:

O sistema de escore clínico foi modificado da literatura (COOK *et al*., 1996; BROK *et al*., 1993) e consistiu na avaliação semanal de cinco parâmetros: i. peso, ii. pele, iii. diarréia, iv. postura e v. atividade. A classificação das alterações encontradas variaram de 0 a 2, atribuindo-se o valor 0 para ausência de alterações e 2 para grandes alterações, de acordo com o quadro 1 (adaptado de Areal, 2009). Os valores atribuídos a cada um dos cinco parâmetros foram somados para obtenção do escore clínico total.

Quadro 3.1: Parâmetros para avaliação clínica da DECH.

ESCORE CLÍNICO
Peso
0. Perda de até 10% do peso inicial
1. Perda de 11 a 25% do peso inicial
2. Perda de mais de 25% do peso inicial
Pêlo
0. Normal
0,5. Pequenas alterações no pêlo (eriçamento)
1. Alterações do pêlo em até 40% do corpo do animal (irregularidades)
1,5. Alterações do pêlo em mais 40% do corpo do animal
2. Alopecia, eritema e/ou lesões na pele
Diarréia
0. Ausente
0,5. Leve (fezes consistentes, mas parcialmente amolecidas)
1. Moderada (fezes ainda consistentes, porém amolecidas)
1,5. Acentuada (fezes sem consistência e com modificações na cor)
2. Severa (fezes líquidas)
Postura
0. Normal
0,5. Parcialmente curvada
1. Curvada apenas em repouso
1,5. Curvada em movimento
2. Totalmente curvada (patas dianteiras mal tocam na área de avalição)
Atividade
0. Normal
0.5. Redução na velocidade da movimentação
1. Movimentação lenta e apenas em parte da área de avaliação
1,5. Movimento apenas quando estimulado
2. Sem movimento mesmo quando estimulado

3.5.5. Mortalidade:

Os animais transplantados foram acompanhados diariamente para avaliação da mortalidade por DECH e elaboração da curva de sobrevida.

3.5.6. Avaliação histopatológica da DECH:

O sistema de Escore Histopatológico foi adaptado da literatura (FERRARA *et al*., 1986; VAN DEN BRINK *et al*., 2000). Foram avaliados a pele, o cólon ascendente e o fígado. Amostras destes órgãos foram retiradas no 21º dia após o TMO e fixadas em formalina [PBS com 10% de Formaldeído (36-38% de pureza, Isofar, RJ, Brasil) – concentração final de 3,6-3,8%].

Após 24 horas, essas amostras foram incluídas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina para posterior observação em microscópio óptico. Foram avaliados quatro parâmetros em cada órgão, com classificação das alterações encontradas em 3 níveis, atribuindo valor 0 para ausência de alterações, 1 para alterações moderadas e 2 para grandes alterações, de acordo com os quadros 2, 3 e 4 (adaptado de Areal, 2009). Os valores atribuídos a cada um dos quatro parâmetros foram somados para cálculo do escore histopatológico total do órgão avaliado.

Quadro 3.2: Parâmetros para avaliação histológica da pele.

Histopatologia | **Pele**
Infiltração inflamatória
0. Ausente **1.** Dispersa **2.** Organizada (dermatite de interface, nódulos, folículos)
Fibrose e perda de anexos
0. Ausente **1.** Redução dos anexos córneos **2.** Redução dos anexos e presença de fibrose ou ausência de anexos no corte
Alterações epidermais
0. Epiderme com espessura normal **1.** Epiderme espessada sem desarranjo das camadas **2.** Epiderme espessada com desarranjo das camadas e apoptose da camada basal (disceratose)
Ulceração
0. Ausente (queratina normal) **1.** Redução de queratina **2.** Ulceração

Quadro 3.3: Parâmetros para avaliação histológica do cólon.

Histopatologia | **Cólon**
Infiltração da lâmina própria
0. Ausente ou rara **1.** Presente e dispersa **2.** Presente formando aglomerados (nódulos, folículos)
Infiltração das camadas profundas
0. Ausente **1.** Presente até a submucosa **2.** Presente além da submucosa
Alterações estruturais
0. Criptas normais **1.** Alongamento de criptas (epitélio hiperplásico) com apoptose e/ou figuras de mitose **2.** Destruição das criptas
Extensão do dano
0. Ausente **1.** Limitado a 25% da área do corte **2.** Superior a 25% da área do corte

Quadro 3.4: Parâmetros para avaliação histológica do fígado.

Histopatologia | **Fígado**
Infiltração inflamatória
0. Ausente ou rara (limitada a células dispersas próximas aos espaços vasculares) **1.** Presente e dispersa pelo parênquima **2.** Presente e formando aglomerados
Alterações globais do parênquima
0. Ausentes **1.** Tumefação ou esteatose focais (<25% do corte) **2.** Tumefação ou esteatose globais (>25% do corte)
Alterações no espaço porta
0. Ausentes **1.** Expansão do espaço porta por infiltração, porém sem destruição das estruturas **2.** Expansão do espaço porta por infiltração, acompanhado de lesão nos ductos biliares e /ou vasos
Sofrimento do parênquima
0. Ausente **1.** Aumento do número de células apoptóticas e/ou figuras de apoptose e ausência de necrose no parênquima **2.** Presença de focos de necrose (áreas de coagulação e/ou microabcessos)

3.6. Avaliação do efeito Enxerto Contra Leucemia:

Para a avaliação do efeito enxerto contra leucemia, os animais receptores receberam juntamente com o transplante de medula óssea 10^5 células do mastocitoma P815 modificadas para expressar a proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein – GFP). No 25º dia após o transplante os animais foram eutanasiados e amostras da medula óssea, baço, linfonodos totais e sangue foram recolhidas para avaliação da presença de células GFP^+ por citometria de fluxo. As células da medula óssea (MO) foram obtidas de acordo com o descrito no item 5.2, já as amostras do baço (Bç), linfonodos totais (Lnt) e fígado (Fig) foram obtidas a partir da dissociação mecânica das células de cada órgão, individualmente, realizada em PBS gelado. Os linfonodos retirados foram os inguinais, axilares, braquiais, faciais e mesentéricos. Todas as suspensões celulares foram mantidas em gelo até a análise no citômetro de fluxo. As amostras de sangue foram obtidas pela veia cava inferior (50µL). O sangue foi acondicionado em microtubos de 200µL aos quais foi previamente adicionado 1 volume de EDTA (Invitrogen, CA, EUA) a 9,6mM em PBS de modo que a concentração final de EDTA fosse de 4,8mM. Para o acompanhamento da sobrevida livre de tumor, foi realizado o monitoramento diário dos receptores quanto à morbidade e mortalidade relacionadas ao crescimento tumoral, por um período de até 20 semanas após o transplante. Vale ressaltar que os animais que apresentavam paralisia total (patas dianteiras e traseiras) foram sacrificados e sua morte contabilizada como sendo em decorrência ao tumor.

3.7. Depleção celular:

Em determinados experimentos as células esplênicas, obtidas de acordo ao descrito no item 5.2, foram submetidas a uma etapa de depleção celular previa ao transplante. Na eliminação das células T reguladoras e dos linfócitos B foi utilizada a separação celular imunomagnética através de Dynabeads (Invitrogen, CA, USA). Para a depleção dos linfócitos T reguladores $CD25^+$, as células esplênicas do doador foram previamente marcadas com o anticorpo *rat-anti-mouse* CD25 IgG. Em seguida, a suspensão celular foi incubada com o *goat-anti-mouse* IgG Dynabead em tampão MACS (PBS pH 7,2; 0,5%BSA; 2mM EDTA) por 15 minutos a 4ºC e submetidas ao protocolo padrão de separação celular fornecido pelo fabricante. A eliminação dos linfócitos B foi realizada pela incubação direta da suspensão de células esplênicas com o goat-anti-mouse IgG Dynabead em tampão MACS por 15 minutos a 4ºC. Seguiu-se, então, o protocolo padrão de separação celular fornecido pelo fabricante. Já a eliminação das células LAP^+ foi realizada foi realizada através da seleção negativa em coluna magnética. Para tanto, as células previamente marcadas com anticorpo *mouse-anti-mouse*

LAP conjugado com ficoeritrina (PE) e, em seguida, incubadas com *anti-Pe-microbeads* (Miltenyi, Auburn, CA) por 30 minutos a 37ºC. As células foram, então, lavadas, ressuspensas em tampão MACS e submetidas à purificação em coluna magnética (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), em acordo com o protocolo padrão de seleção negativa fornecido pelo fabricante. A fração negativa foi recolhida e utilizada como fonte de células T no transplante. Uma amostra desta fração foi mercada com anticorpos anti-CD3 e anti-CD19 para a verificação da frequência de células T e B, respectivamente, na suspensão celular.

3.8. Purificação e transferência adotiva dos linfócitos B esplênicos:

As células $CD19^+$ foram purificadas por separação magnética a partir da suspensão celular do baço de doadores C57Bl/6 tratados com a terapia combinada, doadores C57Bl/6 não tratados e doadores C57Bl/6 deficientes em interleucina 10 (IL-10 KO). Para tal, foi utilizado o *kit* para purificação de células B $CD19^+$ (Miltenyi, Auburn, CA). O procedimento foi realizado de acordo ao descrito no protocolo padrão fornecido pelo fabricante. As suspensões celulares obtidas continham pureza superior a 95% de células $CD19^+$. Para os experimentos de transferência adotiva, $1X10^7$ células $CD19^+$ purificadas foram inoculadas com o enxerto no momento do transplante, mantendo-se a proporção esplênica de duas células B para cada célula T. Quando indicado, o baço utilizado como fonte de células T foi depletado de células B previamente ao transplante e reconstituídos com as células $CD19^+$ purificadas.

3.9. Transplante de pele:

As quimeras F1 pertencentes ao grupo AgF1/Llactis, reconstituídas com células esplênicas de doadores C57Bl/6 tratados com a terapia combinada, e que se encontravam protegidas contra a DECH por mais de 12 meses, foram submetidas a um transplante de pele. Para tanto, doadores das linhagens BALB/c, B10.A e F1 (BALB/cXC57Bl/6) foram sacrificados, tiveram suas caudas removidas e cortadas em quadrados com cerca de 1,2 cm^2. A pele destes fragmentos foi retirada e mantida em placas de petri contendo papel filtro embebido em PBS gelado. As peles permaneceram assim até o momento de sua utilização. As quimeras, receptoras do enxerto de pele, foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (0,58mg/g de peso; Aldrich, USA). Em seguida, os animais tiveram seu dorso tricotomizado e a assepsia local foi realizada com etanol 70%. A área da enxertia foi preparada pela remoção de um fragmento com $1cm^2$ da derme e epiderme até a camada superficial de músculo intrínseco. O enxerto foi gentilmente posicionado sobre a área em que a pele foi removida. Cada animal recebeu dois enxertos no dorso: um proveniente de doadores B10.A e outro de doadores

BALB/c ou F1 (controle de pega), conforme a figura 10.1. Após a enxertia, o local foi coberto com curativo adesivo e os animais mantidos em microisoladores individualmente por até uma semana. Após o término deste período, os curativos foram retirados e iniciou-se o monitoramento dos enxertos. O monitoramento foi realizado diariamente por exame macroscópico quanto ao tamanho, nascimento de pêlos, aderência ao receptor e formação de áreas hemorrágicas ou inflamadas. A rejeição dos enxertos foi estabelecida quando a avaliação mostrou uma redução maior ou igual a 70% de sua área inicial.

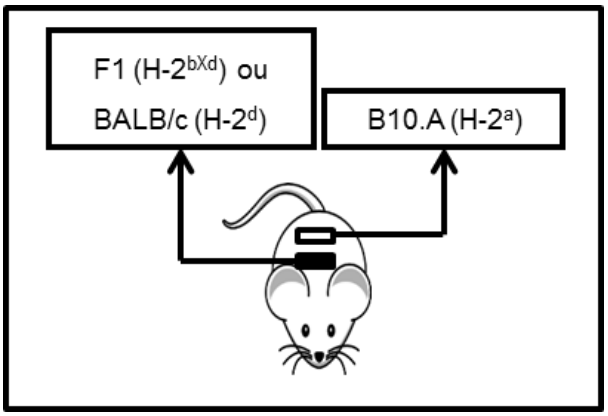

Figura 3.2: Esquema de enxertia das peles.

3.10. Ensaio Imunoenzimático (ELISA):

A detecção das citocinas produzidas nos tecidos afetados pela DECH foi realizada a partir de amostras de pele, cólon ascendente e fígado coletadas no 21º dia pós-transplante. As amostras foram maceradas individualmente em tampão para extração de proteínas (PBS pH7.2; 150mM NaCl; 0,01mM de aprotinina; 1,7mg de PMSF – phenyl-methyl sulfonil fluoride; 2mM EDTA) e congelados a -80ºC até a análise. O perfil de citocinas produzidas em cada tecido foi determinado por ensaio imunoenzimático utilizando *kits* comerciais da eBioscience (CA, USA) para a detecção de IL-10, IFNɣ, TGFβ, Il-17a, IL-17f e IL-22, de acordo com o protocolo específico para cada citocina fornecido pelo fabricante. Além disso, foi realizada a quantificação das proteínas totais de cada amostra, de modo que a quantidade de citocina das amostras pode ser normalizada pela quantidade de proteínas totais das mesmas. Para a quantificação das proteínas totais foi utilizado o kit DC Protein Assay (BioRad®) e segundo o protocolo padrão fornecido pelo fabricante.

3.11. Citometria de Fluxo:

3.11.1. Marcação de moléculas de superfície:

As suspensões celulares obtidas de baço ou linfonodos foram inicialmente lavadas e incubadas em 100µl de PBS + 2% soro normal de camundongo, para o bloqueio de receptores FcγRI/RIII, por 10 minutos a 4°C. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 450g e os sedimentos ressuspensos em 10µl do anticorpo apropriado diluído em tampão de bloqueio e incubados por 15 minutos a 4°C. Em seguida, estas amostras foram lavadas com 100µl de tampão de bloqueio e centrifugadas por 5 minutos a 450g. As células que estavam sendo marcadas com anticorpos biotinilados foram ressuspensas em 10µl da estreptavidina apropriada diluída em PBS por 15 minutos, lavadas com 100µl deste tampão e centrifugadas por 5 minutos a 500g. As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e analisadas no citômetro de fluxo.

3.11.2. Marcações intracitoplasmáticas:

Após a marcação de superfície com os anticorpos apropriados, foi feita a marcação intracitoplasmática para Foxp3, quando necessário, seguindo o protocolo do próprio kit para a detecção desta molécula (eBioscience, San Diego, CA, USA). As células previamente coradas na superfície, conforme o item 10.1, foram lavadas, fixadas com tampão Fix/Perm (eBioscience) e incubadas a 4ºC por 2-18 horas. A seguir, as células foram novamente lavadas e ressuspensas em tampão de permeabilização (eBioscience), sendo novamente lavadas e agora adicionadas de 5µl de *rat-anti-mouse* Foxp3 IgG APC, diluído em tampão de permeablização. As células foram incubadas por 30 minutos, lavadas com tampão de permeabilização e ressuspensas em PBS gelado.

3.11.3. Anticorpos e análise por citometria de fluxo:

Os seguintes anticorpos foram utilizados: CD4 (GK1.5, eBioscience, CA, USA) FITC ou APC; CD8a (53-6.7, eBioscience) PECy7; CD25 (PC61.5, 7D4, eBioscience) PE; Foxp3 APC (FJK-16 – Kit para marcação intracelular - eBioscience); CD3e (145-2C11, eBioscience) FITC ou PECy5; CD11c (HL3, eBioscience) biotinilado; CD11b (M1/70, eBioscience) FITC; CD19 (1D3, eBioscience) PE, PercP-Cy5.5, APC ou FITC; B220 (RA3-6B2, eBioscience) PE; IgM (eB121-15F9, eBioscience) FITC; IgD (11-26c [11-26], eBioscience) APC; CD5 (53-7.3, eBioscience) FITC; CD1d (1B1, eBioscience) PE; CD21 (eBio8D9, eBioscience)

APC-eFluor® 780; CD43 (eBioR2/60, eBioscience) PE; CD40 (1C10, eBioscience) APC; CD86 (GL1, eBioscience) FITC; B7H2 (HK5.3, eBioscience) biotinilado; I-A/I-E (M5/114.15.2, eBioscience) APC; H-2Kb (AF6-88.5.5.3, eBioscience) biotinilado ou APC; H-2Kd (SF1-1.1.1, eBioscience) PE; LAP (TW7-16B4, Biolegend, CA, USA) PE e estreptavidina (eBioscience) FITC, PE, PerCP ou APC. Todas as análises foram adquiridas no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA) ou no citômetro FACSCanto (BD Biosciences, CA, USA), utilizando os programas CellQuest (BD Biosciences) e BD FACSDiva (BD Biosciences), respectivamente. As análises foram realizadas no programa FlowJo (Tree Star, INC, OR, USA).

3.12. Análise estatística:

Para a confecção dos gráficos e realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software). Foram utilizadas análises de variância de um ou dois fatores, com pós-teste de Bonferroni, ou teste *t* de Student. Para a comparação entre as curvas de sobrevida foi realizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox). Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (SD). As médias foram consideradas diferentes quando a probabilidade de serem iguais foi menor que 5% ($p < 0.05$), de acordo com os testes indicados. Os valores $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$ estão representados nas figuras pelos símbolos *, ** e ***, respectivamente.

4. RESULTADOS:

4.1. O tratamento do doador com a terapia combinada inibe o desenvolvimento da Doença Enxerto Contra Hospedeiro aguda.

A fim de investigar a eficácia da tolerização do doador contra o desenvolvimento da DECH aguda, camundongos doadores da linhagem C57Bl/6 receberam doses intragástricas (gavagem) diárias de extrato de proteínas do receptor enquanto a bactéria *Lactococcus lactis* era ofertado em esquema de livre oferta (*ad libitum*), em substituição à água de beber, durante cinco dias (Terapia Combinada).

Para a indução da doença enxerto contra hospedeiro aguda, foi utilizado o modelo semi-alogeneico, onde receptores F1 irradiados letalmente foram reconstituídos com células de medula óssea de doadores C57Bl/6 não-tratados. A fim de investigar a eficácia do protocolo de tolerização oral do doador, células esplênicas de animais tratados ou com terapia combinada (AgF1/Ll), apenas com antígeno de F1(Ag), apenas com a bactéria (Ll) ou não tratados (grupo controle positivo de doença – Ctr+), foram co-injetadas com as células de MO. Como controle negativo de doença (Ctr-), foi realizado um transplante singeneico, onde receptores F1 irradiados letalmente foram reconstituídos com células de medula óssea e baço provenientes de doadores de sua mesma linhagem.

Conforme o demonstrado pela figura 4.1A o grupo de animais receptores reconstituídos com baço de doadores tratados com a terapia combinada (Ag/Ll) apresentou uma elevada taxa de sobrevida se comparado aos demais grupos. Quando os parâmentros clínicos foram avaliados, uma importante diminuição na severidade da doença foi observada neste grupo em comparação aos demais. No entanto, quando utilizados separadamente, os tratamentos de indução de tolerância oral ou a administração do probiótico (grupos AgF1 e Llactis, respectivamente) resultaram apenas em uma discreta proteção (Figura 4.1A, B e C).

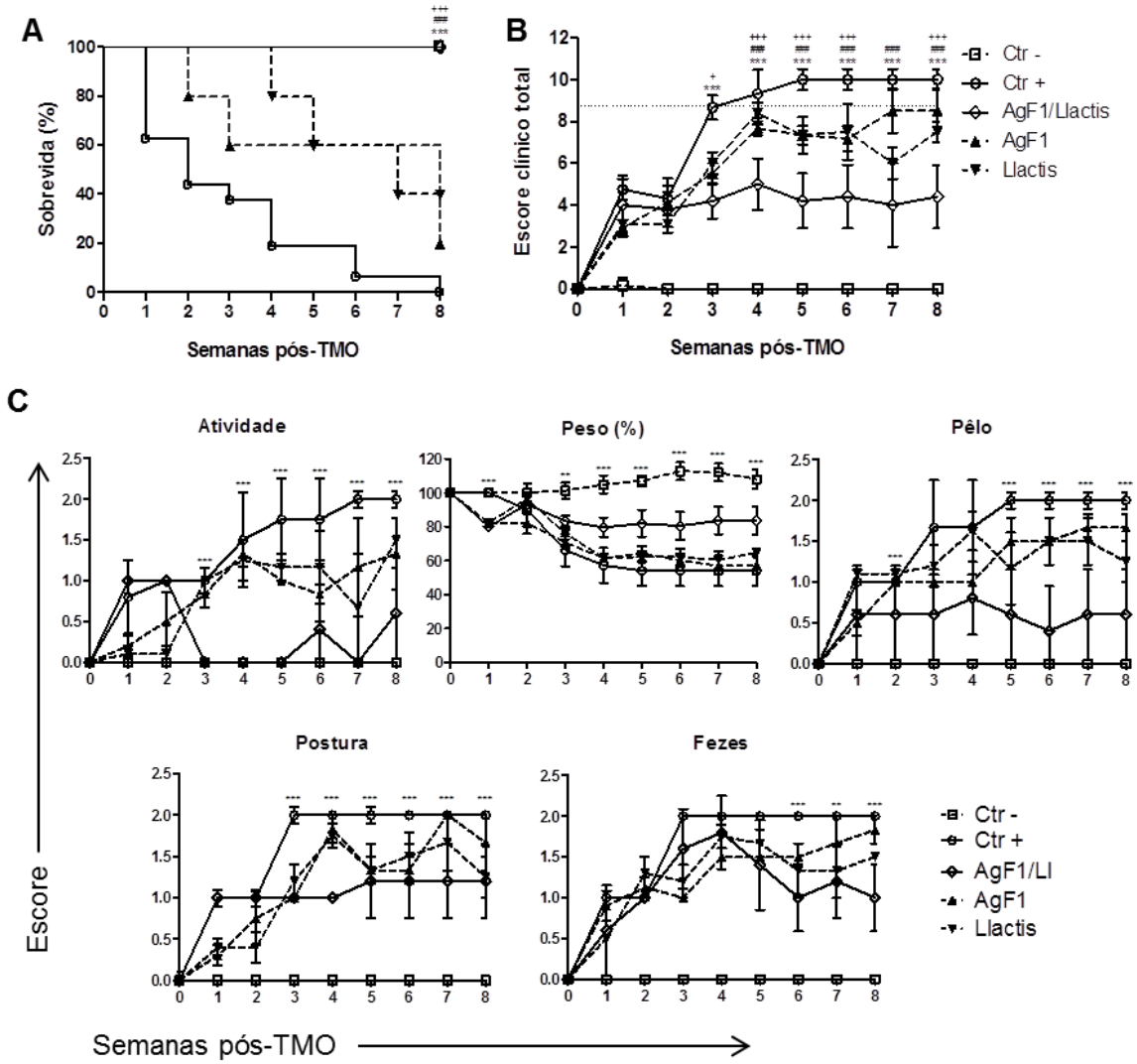

Figura 4.1: Tratamento do doador com a terapia combinada reduz os sintomas clínicos da DECH aguda. Camundongos F1 (BALB/c X C57Bl/6) irradiados letalmente foram reconstituídos com $5X10^6$ células de medula óssea provenientes de camundongos não tratados em conjunto com $5X10^6$ células T esplênicas obtidos de camundongos não tratados C57Bl/6 (Ctr+) ou camundongos C57Bl/6 tratados por via oral com extrato de proteínas de animais F1 (AgF1), com *Lactococcus lactis* (Llactis), em esquema de livre oferta, ou tratados com ambos – Terapia Combinada (AgF1/Ll). (A) Taxa de sobrevida. (B) Escore clínico total. (C) Escores individuais de atividade, peso, pêlo, postura e fezes. Dados representativos de dois experimentos independentes, com n= 5-8 animais/grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (*)AgF1/Ll *vs* Ctr+; (#)AgF1/Ll *vs* AgF1; (+)AgF1/Ll *vs* Llactis.

A proteção constatada no grupo reconstituído com células esplênicas de doadores tratados com a terapia combinada pode ser confirmada em fotos representativas deste grupo onde se observa aparência da pele/pêlo e postura similares aos animais submetidos ao transplante singeneico. (Figura 4.2 A-C)

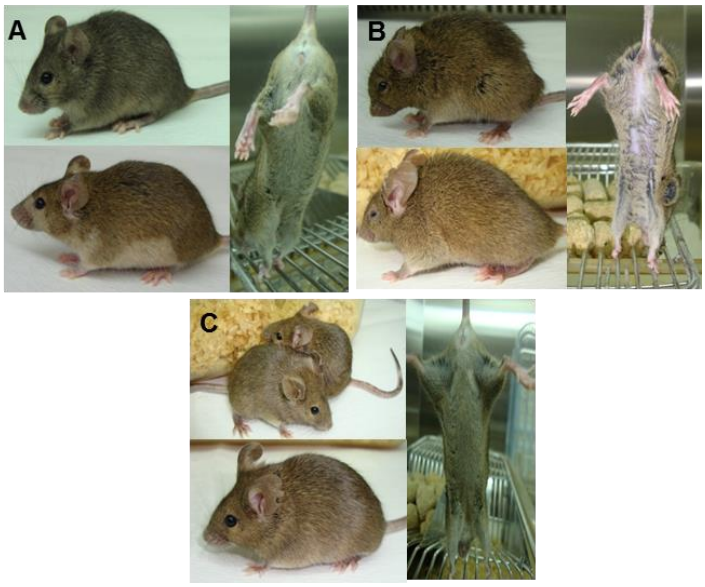

Figura 4.2: Camundongos do grupo AgF1/Ll não apresentaram sinais clínicos aparentes após o 30º dia pós-transplante. Fotografia representativa das quimeras dos principais grupos 30 dias após o TMO. O tratamento do camundongo com a terapia combinada e o transplante de medula óssea foram realizados conforme o descrito na figura 1. (A). Grupo controle negativo de doença; B. Grupo controle positivo de doença; C. Grupo experimental (AgF1/Ll).

A fim de confirmar a proteção observada clinicamente, amostras da pele, cólon e fígado, principais órgãos atingidos pela DECH aguda, foram coletados no 21° dia após o transplante e as possíveis alterações histológicas foram avaliadas de acordo com o escore de patologia descrito anteriormente. Como demonstrado na figura 4.3 A-F, apesar do tratamento com a terapia combinada não inibir completamente a doença, os escores patológicos foram significativamente menores nos receptores reconstituídos com baço de doadores tratados com esta terapia. Mais uma vez foi demonstrado que os tratamentos utilizados separadamente foram ineficazes na proteção contra a DECH.

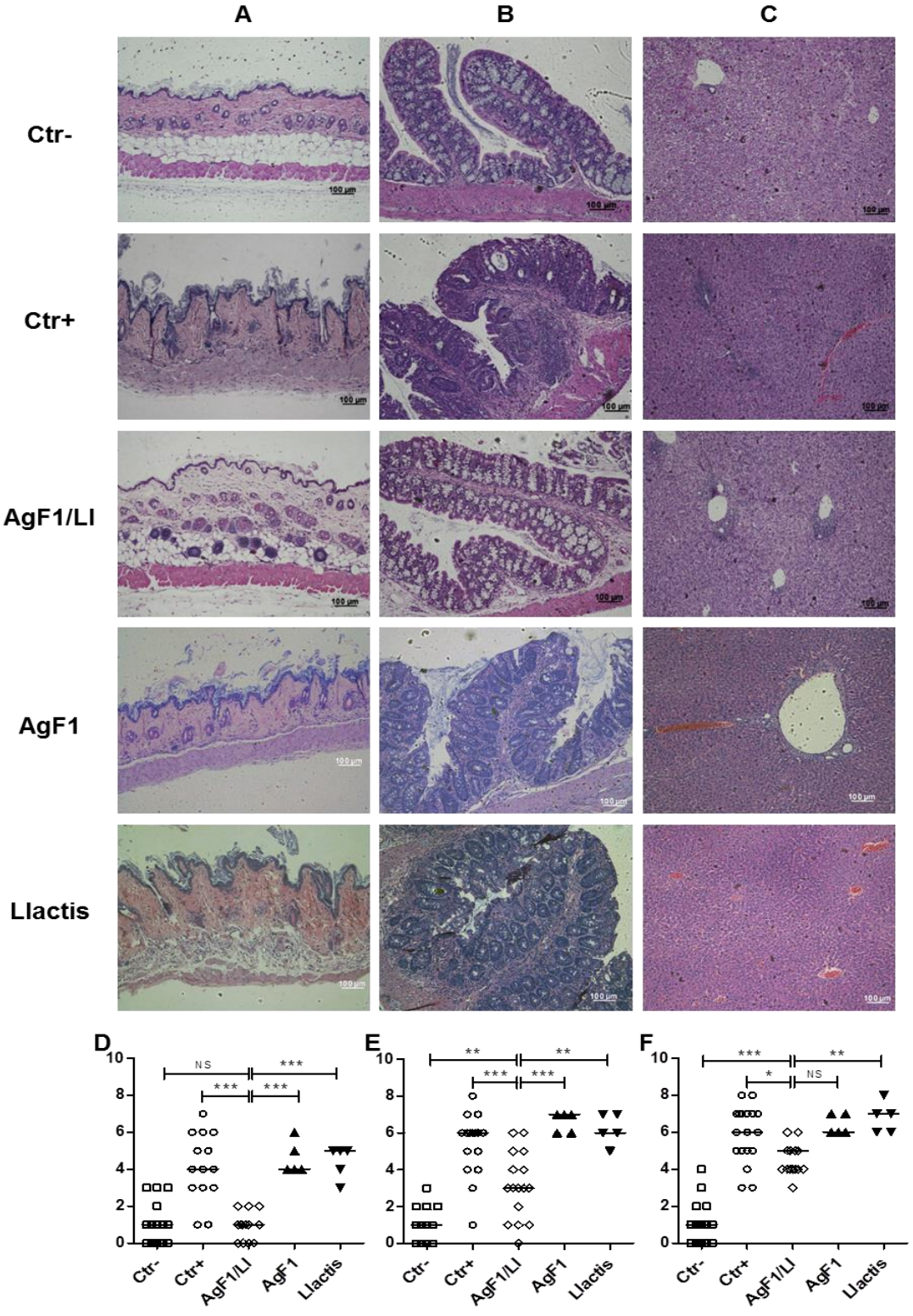

Figure 4.3: Tratamento do doador com a terapia combinada reduz os sintomas histopatológicos da DECH aguda. O tratamento do camundongo com a terapia combinada e o transplante de medula óssea foram realizados conforme o descrito na figura 4.1. Micrografias representativas da pele (A), cólon ascendente (B) e fígado (C) obtidas dos grupos controle negativo de doença, controle positivo de doença, experimental AgF1/Ll, controle AgF1 e controle Llactis, respectivamente, obtidos no 21° pós-TMO. Escore histopatológico total da pele (D), cólon (E) e fígado (F). Dados compilados de diferentes experimentos independentes, com n= 5-18 animais/grupo.* $p< 0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$.

Corroborando o quadro de proteção observado nos animais reconstituídos com baço do doador tratado com a terapia combinada, a análise do padrão de citocinas encontradas nos órgãos-alvo no mesmo período pós-transplante, 21° pós-TMO, revelou uma maior produção de interleucina 10 nestes animais (Figura 4.4 A-C).

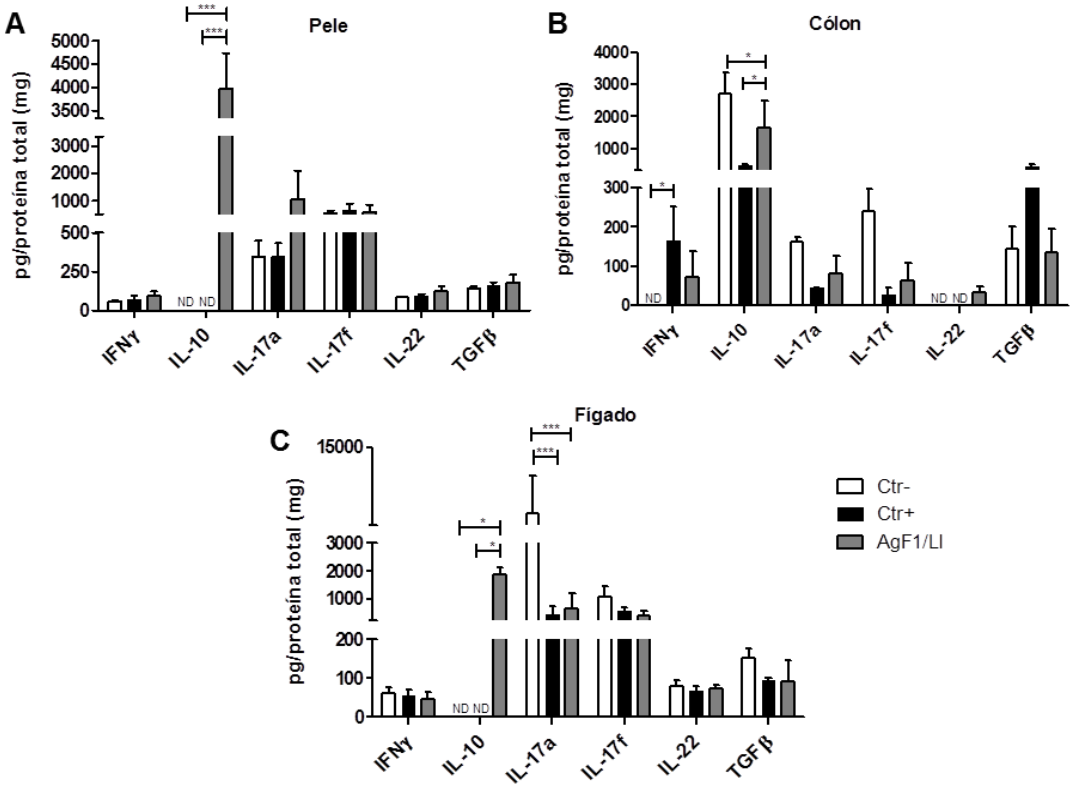

Figura 4.4: O tratamento do doador com a terapia combinada resulta na produção de IL-10 nos órgãos afetados pela DECH aguda no receptor. O tratamento do camundongo com a terapia combinada e o transplante de medula óssea foram realizados conforme o descrito na figura 4.1. No 25º dia pós-transplante camundongos receptores de cada grupo foram eutanaziados e amostras da pele, cólon ascendente e fígado macerados em tampão de extração e congelados a -80ºC até a análise. A produção de citocinas foi determinada por ELISA e a quantificação de proteína total foi realizada pelo kit de quantificação de proteínas (BioRad®). Os dados são mostrados como picogramas de citocina por proteína total da pele (A), cólon (B) e fígado (C) (em miligramas). N= 3-6 animais/grupo.* $p< 0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$.

Em conjunto os dados demonstram que, mesmo não inibindo completamente o desenvolvimento da DECH aguda, a terapia combinada foi capaz de diminuir significativamente morbidade e mortalidade associadas a ela.

4.2. A terapia combinada mantém o efeito Enxerto contra Leucemia e a imunocompetência.

Como a terapia proposta por este trabalho combina dois tratamentos com efeitos imuno-moduladores já comprovados, a proteção observada, principalmente a partir da 4° semana pós-transplante, poderia ser resultado de um estado de imunossupressão geral que possivelmente iria interferir na resposta do receptor a outros antígenos. Assim, para investigar se a supressão induzida pela terapia era específica aos antígenos do hospedeiro, receptores protegidos por mais de um ano após o transplante receberam enxertos de pele provenientes de camundongos B10.A, BALB/c e F1 (C57Bl/6 X BALB/c). Como demonstrado na figura 4.5, as quimeras protegidas rejeitaram especificamente o enxerto de pele proveniente de camundongos B10.A, enquanto aceitaram as peles provenientes de camundongos F1 e de camundongos BALB/c.

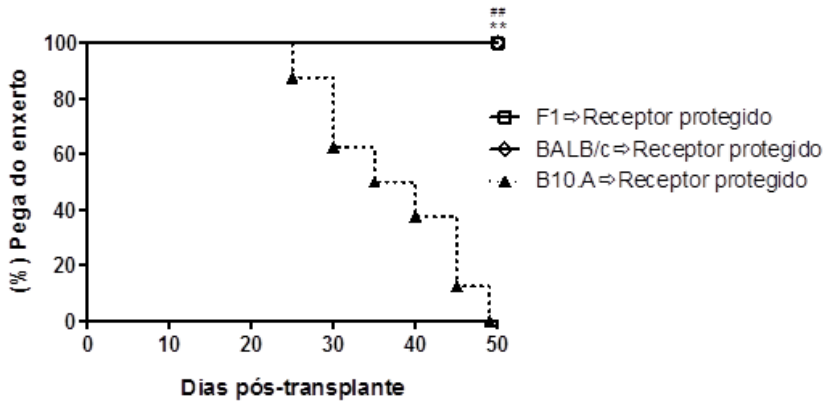

Figura 4.5: A terapia combinada reduz o desenvolvimento da DECH de maneira específica e duradoura. Quimeras protegidas da DECH por mais de um ano receberam, em seu dorso, dois enxertos de pele um proveniente de camundondos B10.A e outro proveniente de camundongos BALB/c ou F1 (C57Bl/6XBALB/c). Os enxertos foram examinados semanalmente até o fim do experimento e foram considerados rejeitados quando sua avaliação macroscópica mostrou uma redução de pelo menos 70% do tamanho original. N= 4 animais/grupo ** p< 0.01. (*)B10.A *vs* BALB/c; (#)B10.A *vs* F1.

Quando o transplante de medula óssea é utilizado como terapia no tratamento de malignidades hematológicas, o papel das células T provenientes do doador vai além de apenas melhorar a pega das células hematopoiéticas e acelerar a reconstituição imunológica (VALLERA *et al*., 1989; MONTEIRO *et al*., 2005; SHLOMCHIK *et al*., 2007): estas células são essenciais na prevenção da recaída da doença de base, pois medeiam o efeito enxerto contra leucemia. Desta forma, uma terapia adequada no tratamento da DECH aguda deve não apenas diminuir a doença, mas manter o efeito benéfico (APPELBAUM, 2003). Para investigar se a terapia combinada é capaz de tal objetivo, junto ao enxerto, foram inoculadas

células de mastocitoma P815 modificadas para expressar GFP. No 25° dia após o transplante, amostras da medula óssea, baço, linfonodos totais, sangue e fígado foram coletadas e analisadas no citômetro de fluxo quanto à presença de células GFP^+. De acordo com o esperado devido à ausência de resposta alogeneica, células GFP^+ foram encontradas em todos os órgãos analisados do grupo de controle negativo de doença. Da mesma forma, como o previsto devido à presença da resposta alogeneica, não foram encontradas células GFP^+ nos órgãos analisados dos animais pertencentes ao grupo de controle positivo de doença. Surpreendentemente, no entanto, mesmo apresentando uma doença mais branda, os animais reconstituídos com baço de doadores tratados com a terapia combinada foram capazes de eliminar o tumor, de modo que não foram encontradas células GFP^+ nos órgão analisados deste grupo (Figura 4.6A).

As quimeras protegidas permaneceram livres de tumor por mais de 20 semanas após o transplante, enquanto as quimeras dos grupos de controle negativo e de controle positivo de doença morreram com claros sinais de crescimento tumoral e doença enxerto contra hospedeiro, respectivamente (Figura 4.6B).

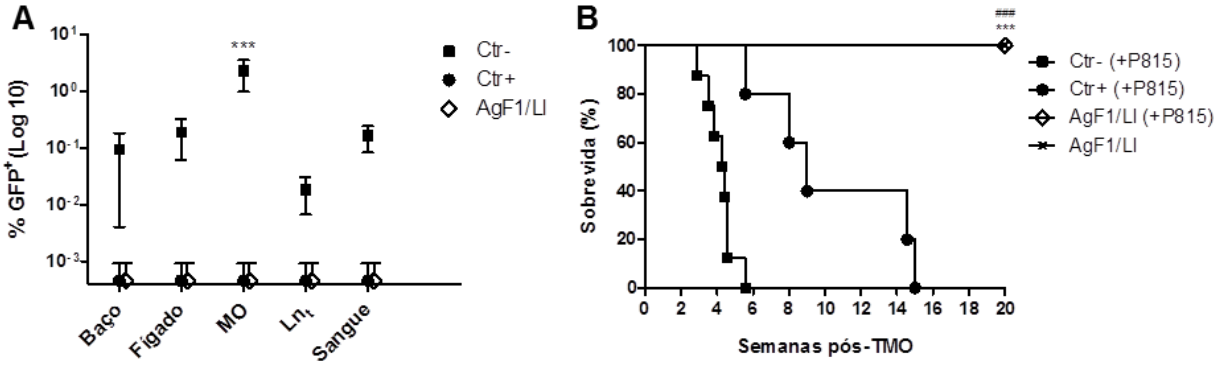

Figura 4.6: A terapia combinada preserva o efeito enxerto contra leucemia. O tratamento do camundongo com a terapia combinada e o transplante de medula óssea foram realizados conforme o descrito na figura 4.1. Em conjunto com as células-tronco hematopoiéticas foram inoculadas 10^5 células de mastocitoma (P815) produtoras de GFP. (A) No 25º dia pós-transplante amostras do baço, fígado, medula óssea (MO), linfonodos totais (Ln_t) e sangue das quimeras foram analisadas por citometria de fluxo na procura por células GFP^+. (B) Taxa de sobrevida das quimeras que receberam as células tumorais. Dados representativos de 3 experimentos independentes, com n= 5 animais analisados individualmente por grupo. * $p< 0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$. (*) AgF1/Ll (+P815) *vs* Ctr+ (+P815); (#)AgF1/Ll (+P815) *vs* Ctr- (+P815).

Em conjunto, os dados demonstraram que o tratamento do doador com a terapia combinada reduziu os sintomas clínicos e patológicos do desenvolvimento da DECH aguda de forma específica e duradoura enquanto manteve o efeito benéfico do Enxerto contra Leucemia.

4.3. A proteção contra a DECH aguda não é mediado por células T reguladoras Foxp3$^+$.

O fenômeno da tolerância oral pode ocorrer por diferentes mecanismos que variam desde anergia ou mesmo deleção dos clones antígeno-específicos até a indução de células T reguladoras com atividades supressoras. De fato, este último mecanismo é geralmente associado à indução de tolerância oral com baixas doses do antígeno (FARIA & WEINER, 2005; WEINER *et al*., 2011). A fim de investigar o mecanismo pelo qual a terapia combinada exerce seu efeito protetor contra a DECH aguda, as células esplênicas provenientes de camundongos C57Bl/6 tratados e não tratados com a terapia combinada foram analisadas por citometria de fluxo.

Não foram observadas diferenças significativas no número absoluto ou na frequência das principais subpopulações celulares analisadas (Figura 4.7 A e B). Mesmo em relação à população de células CD4$^+$Foxp3$^+$ não houve uma diferença que pudesse explicar o efeito protetor.

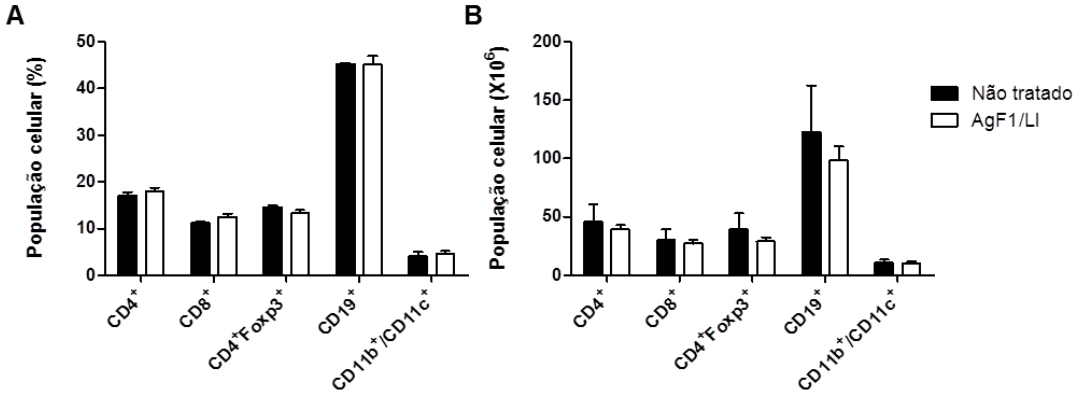

Figura 4.7: A terapia combinada não afeta a distribuição da população de leucócitos no baço do doador tratado. Camundongos doadores foram tratados com a terapia combinada conforme o descrito anteriormente. A análise dos baços foi realizada seis dias após a dose reforço. Camundongos não tratados foram utilizados como controle. (A) Frequência das subpopulações do baço. (B) Número absoluto das subpopulações esplênicas. Dados representativos de três experimentos, n=5 animais/grupo.

No entanto, embora as células T reguladoras presentes no baço de doadores tratados com a terapia combinada sejam quantitativamente equivalentes às observadas nos animais não tratados, ainda é possível que no último grupo estas células não sejam funcionais ou eficazes na regulação da resposta alogeneica. Ou seja, a diferença entre as células reguladoras nestes dois grupos seria qualitativa e não quantitativa. Com o intuito de investigar o papel das células T reguladoras do doador na proteção contra DECH, as células esplênicas provenientes de camundongos tratados com a terapia combinada foram depletadas de células CD25$^+$. Conforme mostrado na figura 4.8 A e B, a eliminação prévia ao transplante das células

reguladoras do doador tratado não afetou a proteção contra a DECH aguda no receptor, confirmando que estas células não são as responsáveis pelo efeito protetor observado.

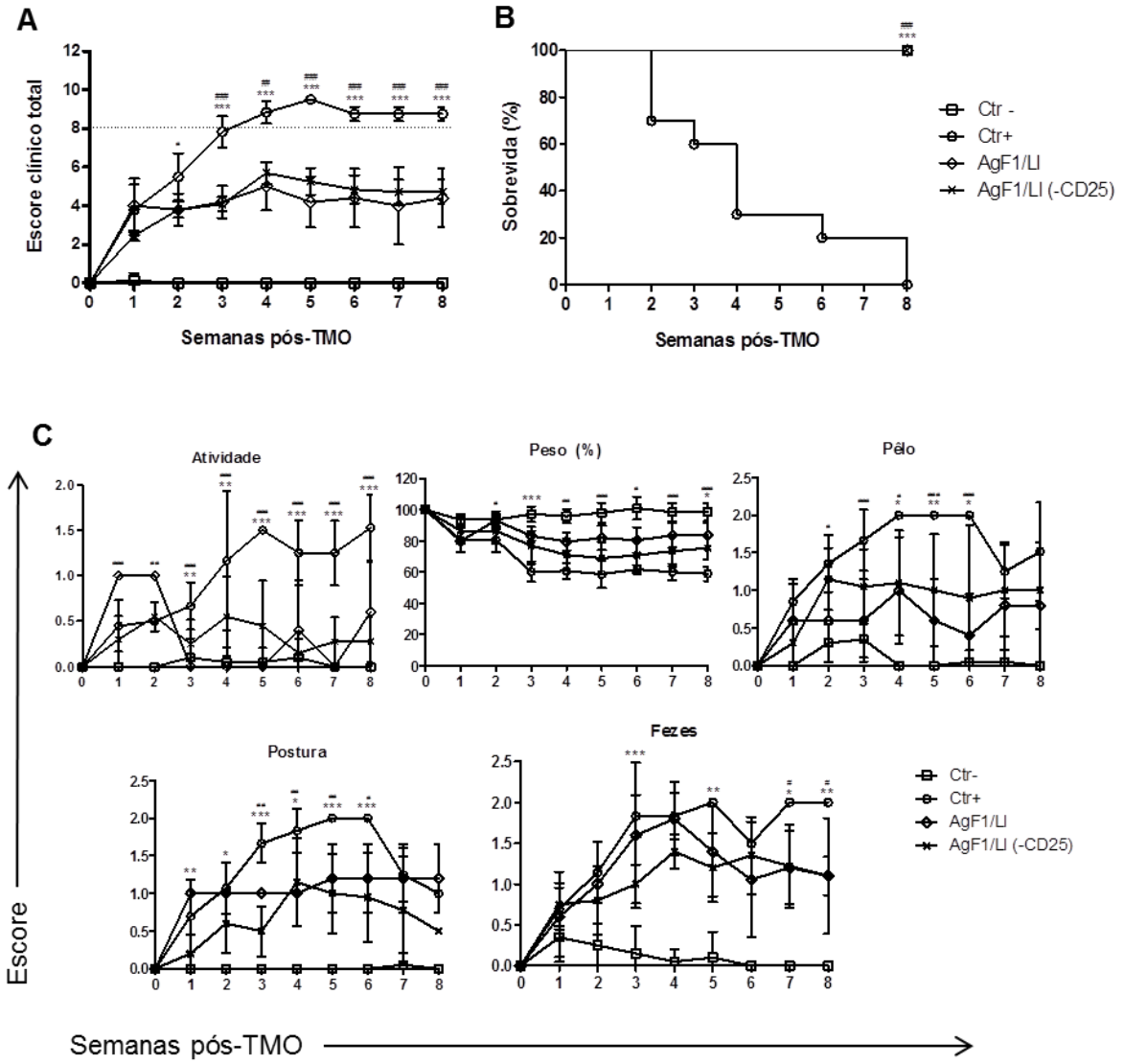

Figura 4.8: A eliminação das células T CD25$^+$ do doador antes do transplante não afeta a proteção conferida pela terapia combinada. O tratamento do camundongo com a terapia combinada e o transplante de medula óssea foram realizados conforme o descrito na figura 4.1. Antes do transplante células T CD25$^+$ foram depletadas do baço de doadores tratados com a terapia combinada. (A) Escore clínico total. (B) Taxa de sobrevida. (C). Escores clínicos individuais. N= 10 animais/grupo. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (*)AgF1/Ll (-CD25+) *vs* Ctr+; (#)AgF1/Ll *vs* Ctr+.

4.4. As células B do doador tolerizadas pela terapia combinada são as responsáveis pela proteção contra DECH aguda.

Estudos recentes em camundongos B-deficientes têm demonstrado a participação de linfócitos B na imunorregulação e proteção contra colite (MIZOGUCHI *et al*., 1997), artrite induzida por colágeno (EVANS *et al*., 2007), diabete autoimune (TIAN *et al*., 2005) e

encefalomielite (WOLF *et al*., 1996). Também em humanos, células B com funções reguladoras foram descritas em pacientes com esclerose múltipla (DUDDY *et al*., 2007) e lúpus eritematoso sistêmico (BLAIR *et al*., 2010). Especificamente em modelos de tolerância oral, os linfócitos B parecem ter um papel fundamental na tolerância induzida com baixas doses do antígeno, por criar o microambiente de citocinas necessário à indução de imunossupressão ativa nos órgãos linfóides associados ao intestino (GONNELLA *et al*., 2001). Como a terapia combinada é baseada na indução de tolerância com doses baixas do extrato de proteínas de camundongos F1, o papel das células B no protocolo de terapia combinada foi avaliado. Para tanto, as células B ($CD19^+$) foram depletadas do baço de doadores tratados com a terapia combinada previamente ao transplante. Conforme o indicado na figura 4.9 A, a eliminação dessas células resultou na quebra da proteção antes observada, refletindo em escore clínico e taxa de mortalidade elevados neste grupo (AgF1/Ll[-L$_{\emptyset}$B]) quando comparado ao grupo reconstituído com baço total (AgF1/Ll).

Uma vez que o papel dos linfócitos B na doença enxerto contra hospedeiro ainda é controverso (SCHULTZ *et al*., 1995; KAMBLE *et al*., 2006; ROWE *et al*., 2006) e baseando-se no fato de que essa população celular é majoritária no baço, a perda da proteção no grupo reconstituído com baço depletado de B poderia ser uma consequência não da ausência de células B tolerizadas pela terapia, mas simplesmente pela ausência total dessa população celular. Para excluir essa possibilidade, células esplênicas de doadores tratados pela terapia combinada e depletadas de linfócitos B foram reconstituídas com células $CD19^+$ purificadas do baço de doadores não tratados (AgF1/Ll [-L$_{\emptyset}$B] + [L$_{\emptyset}$B B6]). A reconstituição não apresentou nenhum efeito: as quimeras desenvolveram a doença e o grupo apresentou elevada taxa de mortalidade. No entanto, quando células $CD19^+$ purificadas de doadores tratados com a terapia combinada foram utilizadas para a reconstituição do baço depletado, a proteção foi totalmente restabelecida (Figura 4.9 A).

A fim de responder se as células B tolerizadas pela terapia combinada eram suficientes para inibir o desenvolvimento da doença enxerto contra hospedeiro, células $CD19^+$ purificadas do baço de doadores tratados foram co-transferidas com células esplênicas e células da medula óssea provenientes de doadores não tratados. De acordo com a figura 4.9 B, a presença de células $CD19^+$ tolerizadas foi capaz de proteger o receptor contra a DECH aguda, diminuindo o escore clínico total e aumentando a taxa de sobrevida neste grupo quando comparado ao grupo controle positivo de doença.

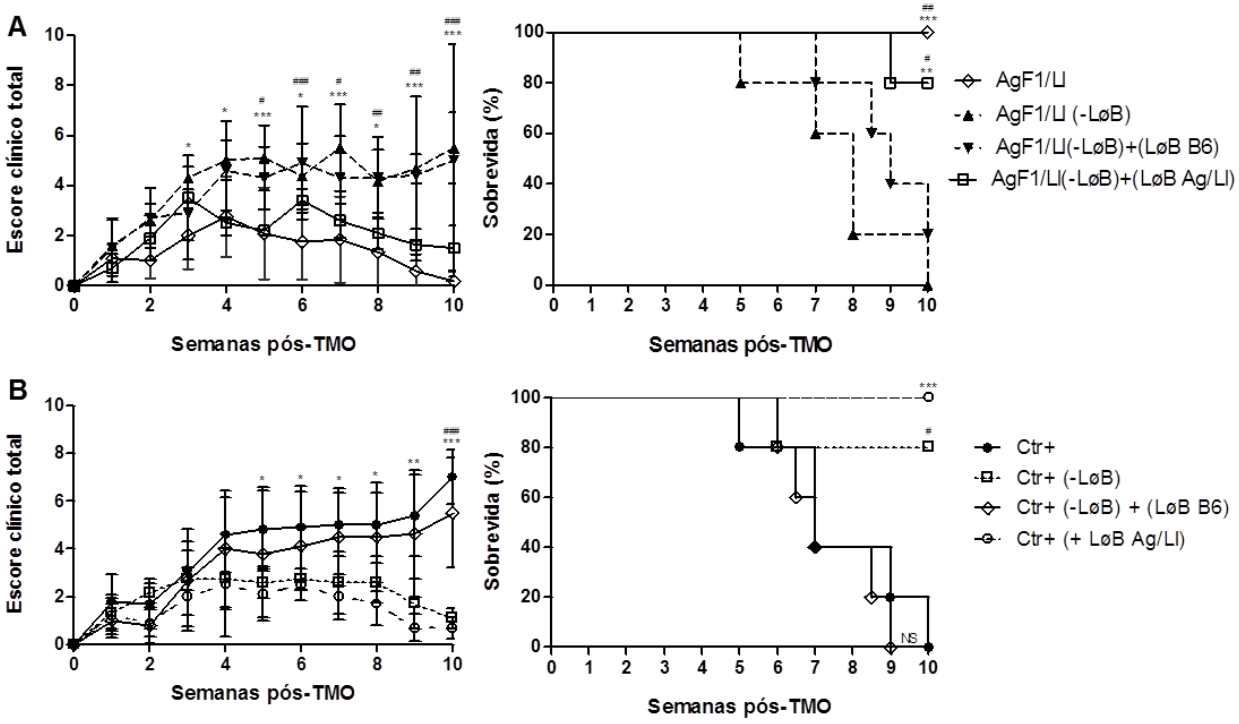

Figura 4.9: A proteção do camundongo receptor contra a DECH é dependente das células B geradas nos doadores pela terapia combinada. O tratamento do camundongo com a terapia combinada e o transplante de medula óssea foram realizados conforme o descrito na figura 4.1. Anteriormente ao transplante células B foram depletadas do baço de doadores tratados ou não com a terapia combinada. (A) Escore clínico total e mortalidade dos animais reconstituídos com esplenócitos de camundongos tratados (grupo AgF1/Ll); esplenócitos de doadores tratados depletados de B (grupo AgF1/Ll[-LøB]) ou esplenócitos depletados de B e reconstituidos com células $CD19^+$ provenientes de doadores tratados (grupo AgF1/Ll[-LøB]+[LøBAg/Ll]) ou não (grupo AgF1/Ll[-LøB]+[LøB B6]) com a terapia. (B) Escore clínico total e mortalidade de camundongos receptores reconstituídos com esplenócitos totais ou depletados de células B proveniente de doadores não tratados em conjunto ou não (grupo Ctr+[-LøB]) com células $CD19^+$ provenientes de doadores tratados (grupo Ctr+[LøBAg/Ll]) ou não tratados (grupo Ctr+[-LøB]+ [LøB B6]). 6-10 animais/grupo. * $p< 0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (*) (AgF1/Ll) vs (AgF1/Ll[-LøB]); (#) (AgF1/Ll) vs (AgF1/Ll[-LøB]+[LøB B6]) no painel A. (*) (Ctr+) vs (Ctr+[-LøB]+[LøBAg/Ll]) no painel B.

Deve-se notar, ainda, que a eliminação prévia ao transplante dos linfócitos B do baço de doadores não tratados resultou na proteção dos receptores contra o desenvolvimento da doença enxerto contra hospedeiro. Este dado não apenas confirma os dados anteriores de que a tolerância induzida pela terapia combinada é dependente de células B tolerizadas, como também, sugere que, pelo menos neste modelo, os linfócitos B têm um papel patogênico no desenvolvimento da doença (figura 4.9 B).

Em conjunto, os dados demonstraram que a proteção do receptor contra a DECH aguda é mediada por linfócitos B com funções reguladoras gerados pelo tratamento do doador com a terapia combinada.

4.5. A administração oral de proteínas do receptor em conjunto com L. lactis induz um aumento na expressão de MCH de classe II, CD86 e LAP nas células B esplênicas.

Com o objetivo de caracterizar os linfócitos B envolvidos na proteção contra a DECH, as células esplênicas $CD19^+$ de doadores tratados ou não com a terapia combinada foram analisadas por citometria de fluxo. Quando os linfócitos B foram agrupados de acordo com sua expressão de imunoglobulina M e D, foi encontrado uma frequência aumentada de células transicionais ($CD19^+IgM^+IgD^{lo}$) nos animais tratados quando comparados aos não tratados (Figura 4.10 A e B). Não foram observadas diferenças entre as populações imaturas ($CD19^+IgM^{hi}IgD^-$) e maduras ($CD19^+IgM^{lo}IgD^+$), sugerindo que a terapia combinada induz um aumento nas células B transicionais.

No entanto, diversos fenótipos já foram atribuídos a células B com funções reguladoras e, pelo menos duas subpopulações já foram descritas: i. Células Breg transicionais e ii. Células B10 (SHIMABUKURO-VORNHAGEN *et al*., 2009). Em comum, ambas as populações expressam as moléculas CD21 e CD1d em sua superfície, sendo a subpopulação B10 também positiva para molécula CD5 (MAURI & BLAIR, 2010). Apesar da expressão total de CD21 estar elevada na população B esplênica dos animais tratados com a terapia, as subpopulações $CD19^+CD21^+CD1d^+$ e $CD19^+CD21^+CD1d^+CD5^+$ encontram-se reduzidas nestes animais (Figura 4.10 D e E).

Embora não haja um marcador único ou um conjunto de marcadores que identifique exclusivamente uma célula B reguladora, sabe-se que a expressão de moléculas como CD86 (MANN *et al*., 2007) e MHC de classe II (MAURI & BALIR, 2010) é necessária para a maioria de suas funções supressoras, independente de um fenótipo específico. De fato, os linfócitos esplênicos dos doadores tratados com a terapia combinada apresentam níveis elevados de ambas as moléculas quando comparados aos não tratados (Figura 4.10 C).

O LAP é um peptídeo associado de modo não-convalente ao dímero de TGF-β maduro, prevenindo sua atividade. A expressão deste peptídeo em células T é utilizada na identificação das células Th3, uma subpopulação de linfócitos T reguladores associados à proteção contra inflamação em inúmeras síndromes autoimunes (MILLER *et al*., 1992; KITANI *et al*., 2000; OIDA *et al*., 2003). Baseando-se nestes dados, a expressão de LAP nas células $CD19^+$ foi avaliada. Quando comparados os animais tratados e não tratados, foi encontrada uma frequência maior de células $CD19^+LAP^+$ no primeiro grupo (Figura 4.10 F e G).

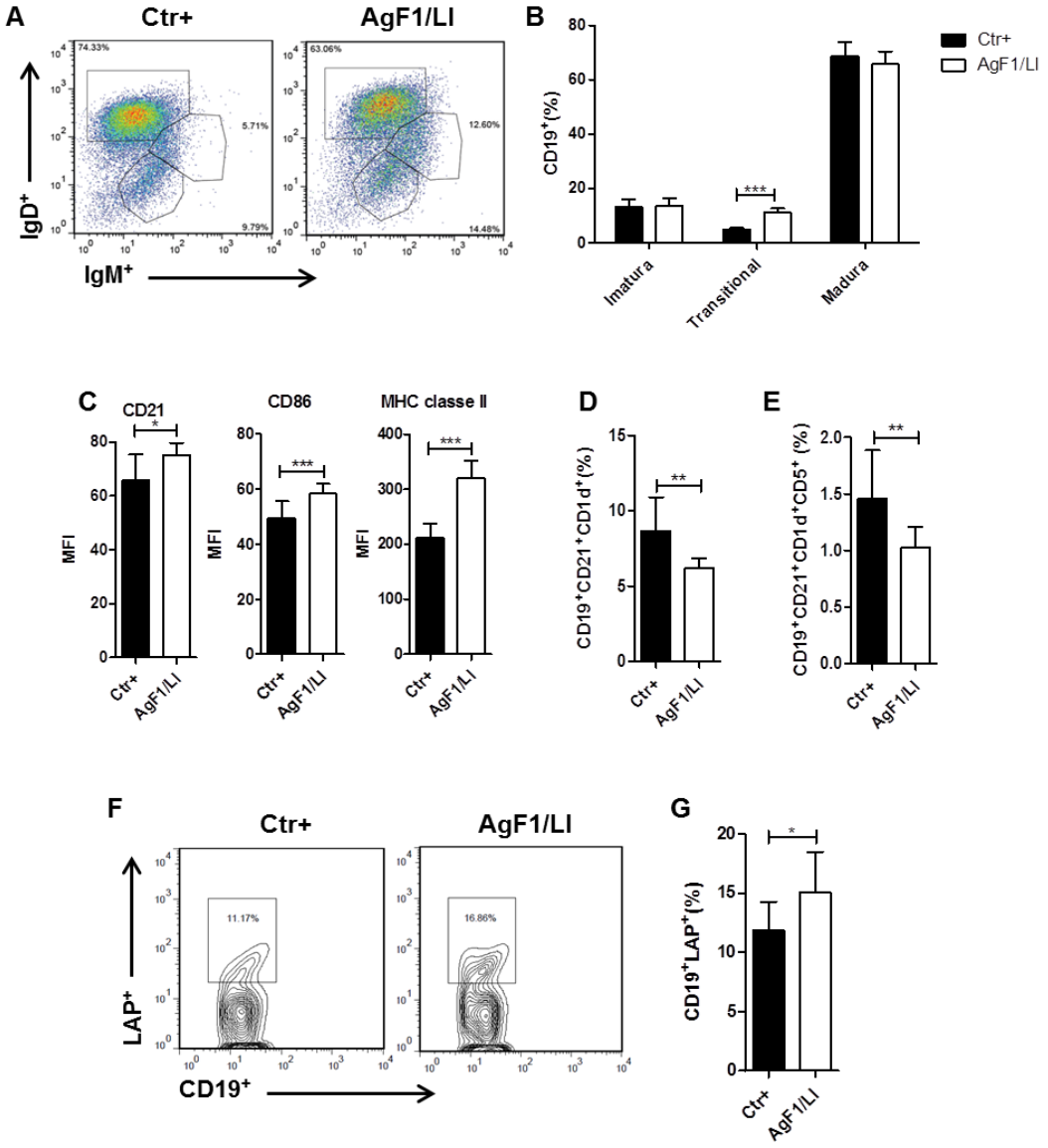

Figura 4.10: Células B geradas pela terapia combinada nos doadores são fenotipicamente compatíveis com células B reguladoras. Os camundongos doadores foram tratados com a terapia combinada conforme o descrito na figura 4.1 e os esplenócitos foram analisados ao fim do tratamento. (A) Frequência de células B imaturas ($CD19^+IgM^{hi}IgD^-$), transicionais ($CD19^+IgM^+IgD^{lo}$) e madura ($CD19^+IgM^{lo}IgD^+$). Expressão de CD21 (B), CD86 (C) e MHC de classe II (D) nas células B $CD19^+$ (MFI). Frequência de células $CD19^+CD21^+CD1d^+$ (D) e de células $CD19^+CD21^+CD1d^+CD5^+$ (E). (F) Frequência de células B LAP^+. (G) Quantificação de (F). Os dados são representativos da análise individual de 10 camundongos/grupo. * $p< 0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

A importância das células LAP$^+$ para a proteção induzida pela terapia combinada foi confirmada após a eliminação destas células do baço de doadores, tratados ou não, previamente ao transplante. A depleção das células LAP$^+$ do baço dos animais tratados inibiu a proteção, elevando tanto os sinais clínicos da doença quanto a taxa de mortalidade neste grupo (Figura 4.11 A-C).

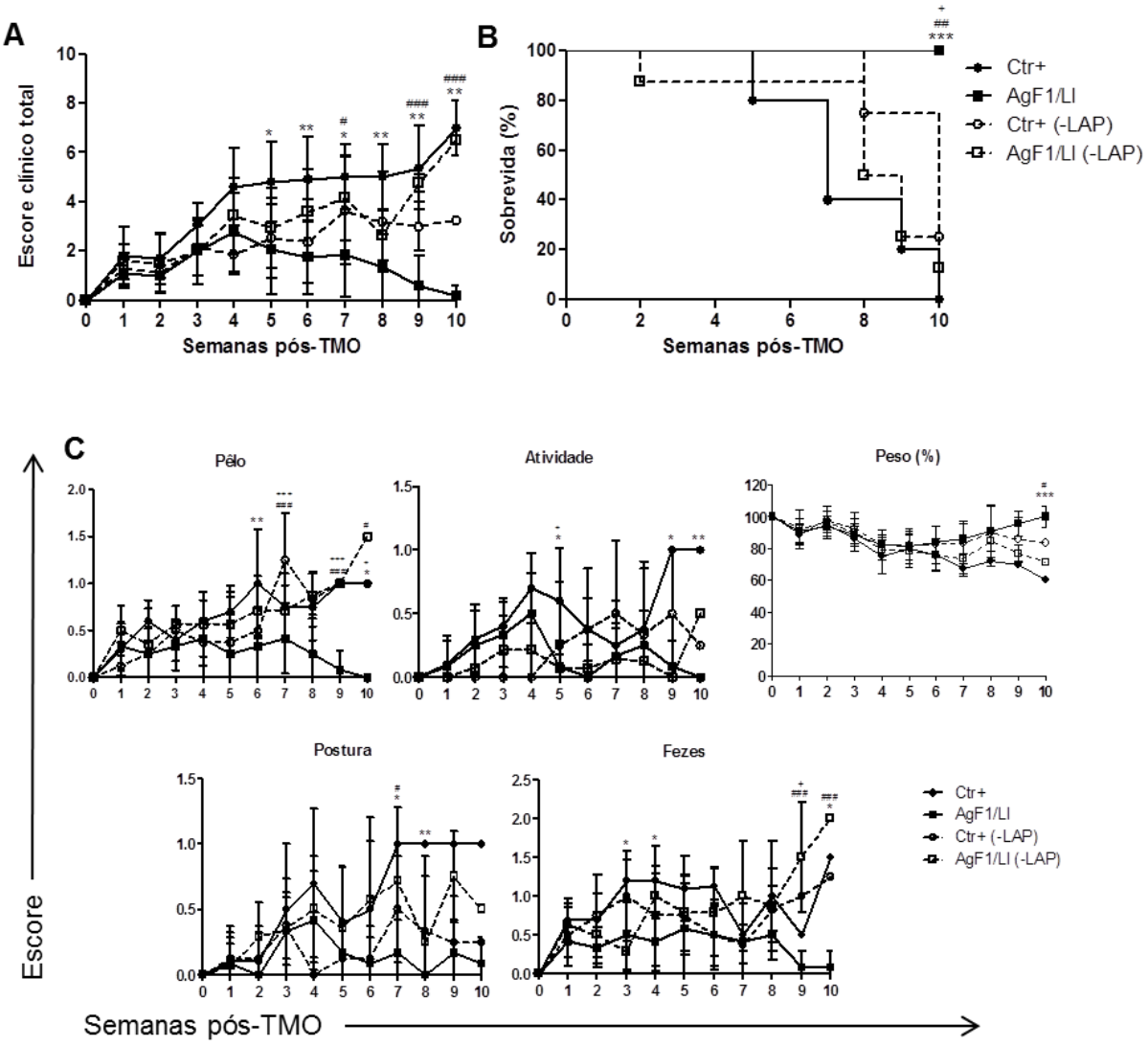

Figura 4.11: A proteção do camundongo receptor contra a DECH é dependente das células LAP$^+$ geradas no doador pela terapia combinada. O tratamento do camundongo com a terapia combinada e o transplante de medula óssea foram realizados conforme o descrito na figura 4.1. Anteriormente ao transplante células LAP$^+$ foram depletadas do baço de doadores tratados com a terapia combinada. (A) Escore clínico total. (B) Taxa de sobrevida. (C). Escores clínicos individuais. N= 5-8 animais/grupo. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (AgF1/Ll) vs (Ctr+); (#) (AgF1/Ll) vs (AgF1/Ll[-LAP]); (+) (AgF1/Ll) vs (Ctr+[-LAP]).

É necessário ressaltar que, devido a limitações experimentais, não foi possível eliminar somente as células CD19$^+$LAP$^+$, dessa forma, possivelmente outras células positivas

para o LAP também foram eliminadas do enxerto. De fato, no decorrer do tempo de avaliação clínica da doença enxerto contra hospedeiro, pelo menos 50% do grupo receptor reconstituído com baço de doadores tratados depletados de células LAP^+ apresentaram quadro muito semelhante à ceratoconjutivite que acomete pacientes humanos e que é normalmente associado à forma crônica da doença. Este quadro não foi observado quando apenas os linfócitos B esplênicos foram eliminados, sugerindo que, neste transplante, outra célula com potencial regulador também foi eliminada.

4.6. A proteção da DECH exercida por célula B induzida pela terapia combinada depende de IL-10

As células B reguladoras são induzidas especificamente em condições de inflamação sendo capazes de suprimir a exacerbação desse quadro inflamatório além de estimular o processo de recuperação tecidual. Essa atividade reguladora pode ser exercida por diferentes mecanismos, sendo a apresentação secundária de antígenos ou interação direta com outras células do sistema imune e secreção de anticorpos. No entanto, a capacidade de produzir interleucina 10 quando estimulada não apenas permeia todos os mecanismos mencionados anteriormente, como também é descrito como essencial para a atividade reguladora desta célula. De fato, apesar de ter sido descrito inicialmente no modelo de encefalomielite autoimune experimental (FILLATREAU *et al*., 2002), a participação de células B produtoras de IL-10 já foi descrita na regulação de diversos modelos autoimunes (EVANS *et al*., 2007; TIAN *et al*., 2005).

Assim, com o objetivo de avaliar a importância da IL-10 produzida pelos linfócitos B tolerizados, células esplênicas $CD19^+$ purificadas de doadores C57Bl/6 deficientes para IL-10 ($IL\text{-}10^{-/-}$) tratados com a terapia combinada foram co-transferidas com células de baço e medula óssea de doadores selvagens não tratados. Como controles, linfócitos B purificados de doadores selvagens tratados ou não com a terapia foram utilizados.

Diferente dos linfócitos B purificados de doadores selvagens tratados, os linfócitos B de doadores deficientes para IL-10, tratados com a terapia combinada, foram incapazes de inibir o desenvolvimento da DECH aguda no receptor, resultando em alta taxa de mortalidade neste grupo (Figura 4.12 A-C).

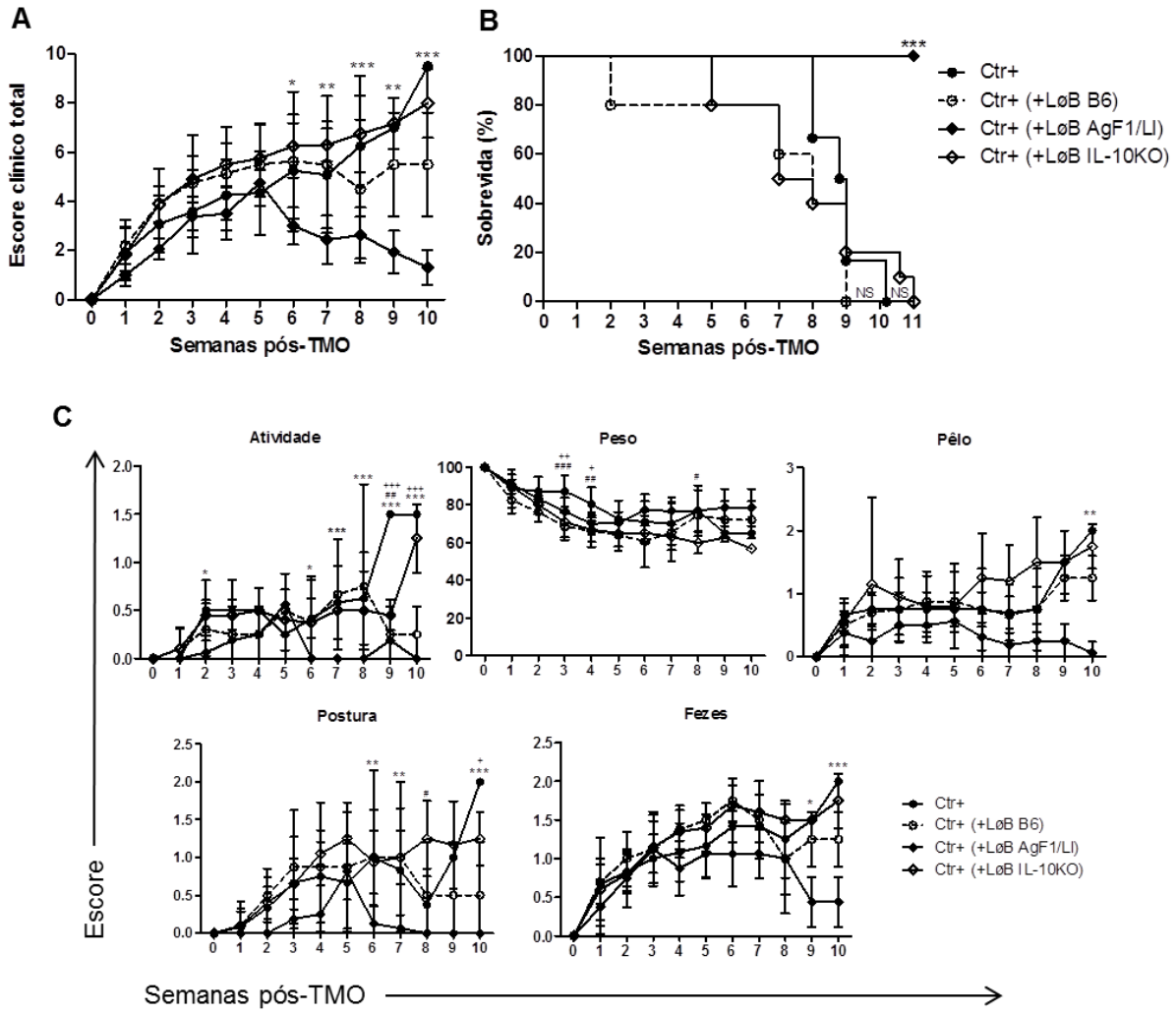

Figura 4.12: A proteção do camundongo receptor contra a DECH é dependente da IL-10 produzida pelas células B tolerizadas. Camundongos F1 irradiados letalmente foram reconstituídos com $5X10^6$ células de medula óssea e $5X10^6$ células T esplênicas provenientes de doadores C57Bl/6 selvagens e não tratados com a terapia combinada (Ctr+). Foram adicionadas ao enxerto 10^7 células $CD19^+$ (LøB) esplênicas isoladas de camundongos doadores C57Bl/6 não tratados (grupo Ctr+LøB B6); doadores C57Bl/6 selvagens (grupo Ctr+LøBAgF1/Ll) ou deficientes para IL-10 (Ctr+LøB IL10KO) tratados com a terapia combinada. (A) Escore clínico total. (B) Taxa de sobrevida. (C). Escores clínicos individuais. N= 5-10 animais/grupo. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (*) (Ctr+) vs (Ctr+ LøB AgF1/Ll).

Estes dados mostram a dependência de IL-10 para que a célula B possa exercer sua ação supressora protegendo o receptor da DECH

4.7. Células B esplênicas do doador tratado com a terapia combinada induzem células reguladoras Foxp3$^+$ no camundongo receptor.

Como mencionado anteriormente, os mecanismos pelos quais as células B reguladoras são capazes de suprimir a inflamação variam desde a produção de citocinas anti-inflamatórias

até a indução de apoptose em células T efetoras, dependendo do tipo de resposta imune em curso. Neste cenário, um crescente conjunto de evidências tem demonstrado o envolvimento de células B reguladoras na geração ou recrutamento de linfócitos T reguladores (SUN *et al*., 2008; SUN *et al*., 2012). Para investigar se as células B tolerizadas pelo tratamento do doador com a terapia combinada eram capazes de induzir a diferenciação ou expansão de células T reguladoras, as quimeras transplantadas com baço controle ou baço depletado de linfócitos B de ambos, doadores tratados ou não, tiveram as células do baço e dos linfonodos mesentéricos e periféricos avaliados para a presença de linfócitos $Foxp3^+$ no dia 4 pós-transplante. Como demonstrado na figura 4.13, as quimeras reconstituídas com células esplênicas provenientes de doadores tratados com a terapia combinada apresentaram elevados frequência e número absoluto de células $Foxp3^+$ nos tecidos analisados. Este quadro foi revertido com a eliminação das células B tolerizadas previamente ao transplante. Deve-se notar que o aumento na subpopulação de células $Foxp3^+$ provenientes do doador acontece apenas no receptor, indicando uma possível relação entre a indução do fenótipo regulador e a disponibilidade de alo-antígenos.

Estes dados em conjunto mostram que as células B tolerizadas provenientes do doador medeiam a proteção contra a DECH pela indução células $Foxp3^+$ nos receptores do transplante.

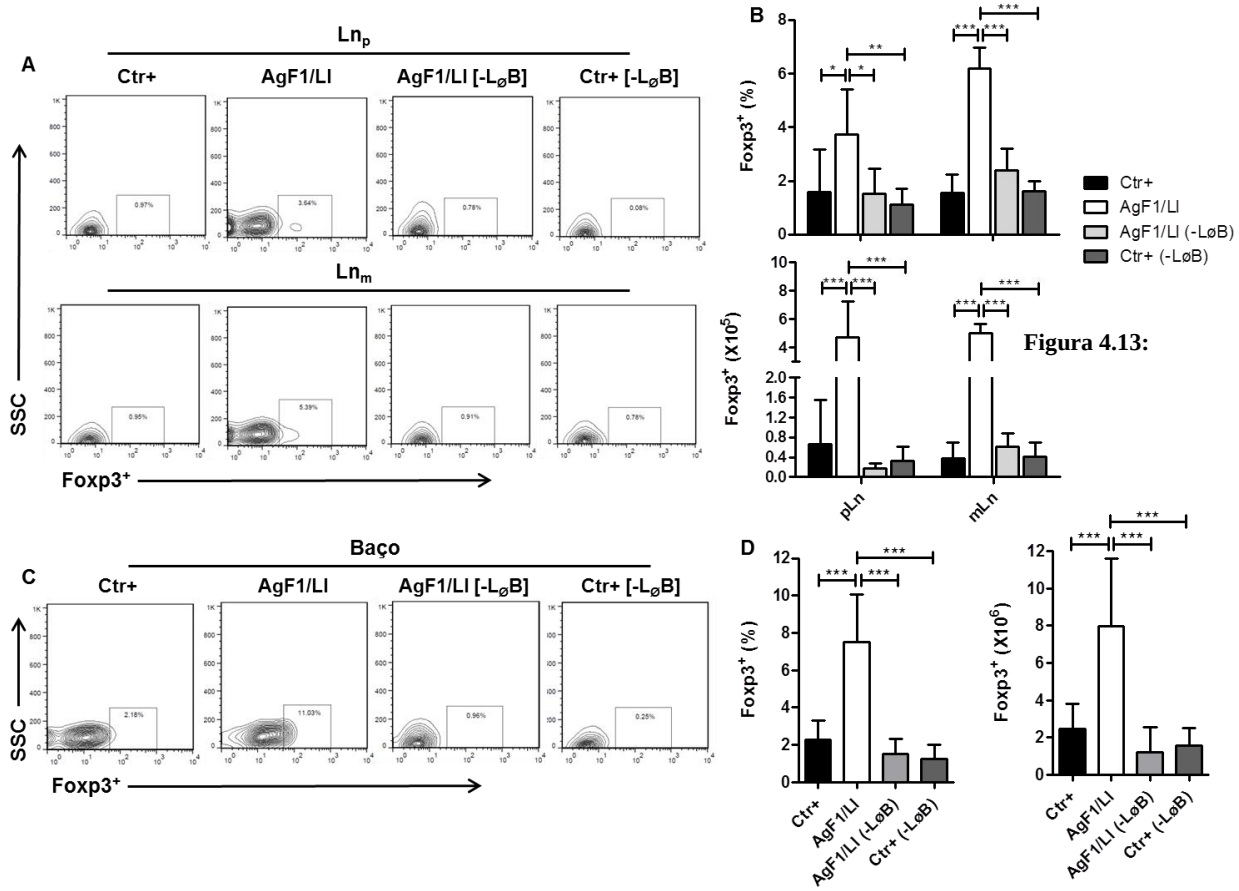

Figura 4.13:

Células B geradas pela terapia combinada aumentam a frequência de células Foxp3$^+$ no camundongo receptor. O tratamento do camundongo com a terapia combinada e o transplante de medula óssea foram realizados conforme o descrito na figura 4.1. Anteriormente ao transplante células B foram depletadas do baço de doadores tratados ou não com a terapia combinada. Quatro dias após o transplante os receptores foram eutanaziados e a presença de H-2K^{b+} H-2K^{d-} Foxp3$^+$ foi analisada no baço, linfonodos mesentéricos e periféricos. Dados representativos de células Foxp3$^+$ nos linfonodos periféricos e mesentéricos (A) e baço (C) dentro da população de células H-2K^{b+} H-2K^{d-}. Frequência e número absoluto de células H-2K^{b+} H-2K^{d-} Foxp3$^+$ no linfonodo periférico e mesentérico (B) e no baço (D). Os dados são representativos da análise individual de 6-8 camundongos/grupo para o baço e análise de 3-4 *pools* de 5 animais para os linfonodos. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

5. DISCUSSÃO:

5.1. A Terapia Combinada e a proteção contra a DECH aguda:

A indução da tolerância oral tem mostrado resultados promissores em várias doenças mediadas pelo sistema imunológico, como esclerose múltipla, artrite reumatóide, escleroderma e diabetes. Porém há poucos dados sobre a utilização dessa técnica na doença enxerto contra hospedeiro. O primeiro trabalho que propôs a utilização da tolerância oral como tratamento alternativo a DECH o fez em um modelo de doença crônica, onde o doador era tratado com proteínas do receptor durante 11 dias prévios ao transplante (NAGLER *et al*., 2000). Conforme mostrado pelos autores, o tratamento oral diminuiu as manifestações patológicas da DECH crônica, sugerindo ser uma terapia eficaz neste modelo. O mesmo grupo mostrou que a tolerância oral também poderia ser eficaz para o tratamento da forma aguda da doença, no entanto, neste trabalho, os autores trataram o próprio receptor do transplante com extrato de proteína autólogas durante 5 dias após o transplante (NAGLER *et al*., 2003). Com isso, os autores procuraram tolerizar as células do doador, recém-infundidas, para proteínas do receptor, diminuindo a sua ativação. De fato, os autores demonstraram que as células do baço de receptores tratados com o extrato de proteínas autólogas apresentavam reatividade reduzida quando co-cultivados com esplenócitos das linhagens parentais. Essa menor reatividade foi mostrada i*n vivo* em um transplante semi-alogeneico onde os receptores tratados apresentaram uma melhora nas manifestações patológicas da DECH aguda acompanhada da sobrevida em torno de 80%, reafirmando que a indução da tolerância oral poderia representar uma terapia alternativa e eficaz no tratamento da DECH.

A importância da microflora intestinal na biologia da doença enxerto contra hospedeiro foi reconhecida logo nos primeiros trabalhos sobre esta doença, quando Jones e colaboradores (1971) observaram que animais *germ free* ou pré-tratados com antibióticos desenvolviam a doença muito tardiamente e de forma menos grave. Atualmente sabe-se que esta proteção é efeito da diminuição ou ablação da translocação bacteriana ou de seus produtos do lúmen intestinal para a circulação sistêmica. Essa translocação, que é resultante da quebra da barreira epitelial induzida pelo regime de condicionamento, é responsável pelo aumento no quadro inflamatório no hospedeiro criando um ambiente propício para a ativação das células T alorreativas do doador. Dada a importância deste fato, em humanos, os regimes de condicionamento são normalmente precedidos por antibiótico-terapia. Entretanto, alguns trabalhos mais recentes (JENQ *et al*., 2012; ERIGUCHI *et al*., 2012) apontam para uma nova hipótese, onde a modulação da flora endógena de forma a deixá-la "menos favorável" ao

desenvolvimento da DECH pode ser mais eficaz no controle da doença do que a sua eliminação por antibióticos. Corroborando esta hipótese, Gerbitz e colaboradores (2004) demonstraram no modelo experimental de DECH aguda que a administração oral de *Lactobacillus rhamonosus* GG reduziu a translocação bacteriana para o linfonodo mesentérico, diminuiu a severidade da DECH aguda sistêmica e aumentou a sobrevida para 60%.

De fato dentre as inúmeras abordagens terapêuticas que têm sido propostas para reduzir a DECH, em especial a forma aguda da doença, a educação do sistema imunológico pela indução da tolerância oral e a manipulação da microbiota intestinal pela ingestão de bactérias probióticas representam terapias viáveis, não-invasivas e seguras para se obter tal objetivo. Contudo, ambas as terapias já propostas (NAGLER *et al*., 2003; GERBITZ *et al*., 2004) esbarram na sua transposição para a clínica médica uma vez que se baseiam no tratamento dos pacientes. Esses pacientes, em geral, apresentam náuseas intensas, quadros de diarreia, vômito e até anorexia durante o regime de condicionamento, não sendo incomum que estes sintomas perdurem por semanas após o término do tratamento, chegando a confundir-se com os sintomas iniciais da própria doença enxerto contra hospedeiro (MALONE *et al*., 2007). Adicionado às complicações gastrointestinais que dificultariam a indução de tolerância oral (ANDRADE *et al*., 2006), eles encontram-se sob severa imunossupressão, o que impede a ingestão de bactérias vivas, inviabilizando o tratamento com os probióticos. Assim, este trabalho procurou focar na imunomodulação do doador combinando duas terapias que comprovadamente afetam o curso da DECH e que apresentavam baixo ou nenhum efeito colateral: a indução de tolerância oral a antígenos do receptor e o tratamento probiótico.

A terapia combinada baseou-se no tratamento oral de animais C57Bl/6 com doses intragástricas de 50µg de extrato proteico de células de baço de animais F1 (C57BL/6 x BALB/c) por cinco dias com a concomitante livre oferta de *Lactococcus lactis*. As células esplênicas destes animais foram utilizadas como fonte de linfócitos T, em conjunto com células de medula óssea de um doador B6 não tratado, para a reconstituição de animais F1 letalmente irradiados. O grupo de animais receptores reconstituídos com o baço de doadores tratados com a terapia combinada apresentaram escores clínicos intermediários e significativamente menores que os escores obtidos pelo grupo reconstituído com baço de doadores não-tratados. Essa diminuição resultou em um escore clínico total inferior, que se refletiu na maior taxa de sobrevida no primeiro grupo.

A proteção clínica contra a DECH foi acompanhada da proteção histopatológica dos órgãos afetados. Ao analisarmos a pele, o cólon e o fígado das quimeras protegidas, observamos que, assim como na análise clínica, a terapia combinada não eliminou a doença em sua totalidade. Ainda foram encontrados pequenos infiltrados nos órgãos-alvo, as quimeras também apresentavam um cólon hiperplásico e no fígado ainda foram observados infiltrados periportais. No entanto, não houve a destruição das criptas do cólon nem destruição dos espaços porta ou comprometimento do parênquima hepático, sugerindo que estes animais desenvolveram uma forma muito mais branda da doença enxerto contra hospedeiro aguda e, portanto, menos letal. Essa proteção tecidual pode estar relacionada à maior expressão de interleucina 10 encontrada nestes tecidos no mesmo período pós-transplante em que foram realizados os exames histológicos.

Ao confirmarmos que o tratamento do doador com a terapia combinada foi capaz de proteger os receptores contra a DECH, nos perguntamos se esta proteção seria resultado de uma imunossupressão generalizada que poderia interferir na resposta do receptor a outros antígenos. Afinal, a terapia combina dois tratamentos que sabidamente são capazes de modular o sistema imunológico, impedindo que respostas inflamatórias, que neste contexto seriam benéficas, aconteçam. Além disso, precisávamos definir se a proteção era específica para o antígeno dado oralmente ao doador e se, assim como observado nos modelos de indução de tolerância oral, esse efeito era duradouro. Para responder a estas questões receptores protegidos da DECH por mais de um ano após o transplante receberam enxertos de pele provenientes de camundongos B10.A, uma linhagem não-relacionada, BALB/c e F1 (C57Bl/6 X BALB/c). A análise da pega dos enxertos mostrou não apenas que as quimeras são imunocompetentes, pois foram capazes de rejeitar somente a pele do doador não relacionado, mas também que a proteção induzida pela terapia combinada no doador gera uma tolerância específica a antígenos da linhagem BALB/c, uma vez que os enxertos de pele provenientes de doadores desta linhagem não foram rejeitados, mesmo após um ano do transplante. Isto seria esperado, já que os animais não apresentam nenhum sinal de doença alo-reativa.

Quando o transplante de células-tronco hematopoiéticas é utilizado no tratamento de doenças malignas, o efeito enxerto contra leucemia é necessário para a total eliminação da doença de base. Assim, um tratamento eficaz contra a DECH deve não somente reduzir a doença, mas ser capaz de manter o efeito benéfico. Surpreendentemente, mesmos protegidos contra a DECH, os receptores reconstituídos com baço de doadores tratados com a terapia ainda foram capazes de eliminar células tumorais e permaneceram livre de tumor por um

longo período pós-transplante. A separação dos efeitos enxerto contra hospedeiro e enxerto contra leucemia pode ser resultado da eliminação do repertório de células reativas contra tecidos do hospedeiro pelos mecanismos envolvidos na proteção, enquanto clones que reconheçam proteínas específicas do tumor ou que são aberrantemente expressos por ele tenham escapado ao controle supressor.

Os dados em conjunto mostram que a terapia combinada gera uma tolerância protetora contra DECH, específica e duradoura, sem prejuízo da resposta enxerto contra leucemia.

5.2. Células B como efetoras da tolerância induzida pela terapia combinada:

Os linfócitos B são capazes de exercer inúmeras funções no organismo, sendo, em geral, considerados como reguladores positivos da resposta imune e grandes colaboradores da patogenicidade de doenças autoimunes por sua habilidade em produzir anticorpos. Nas últimas décadas, porém uma nova função, reguladora, vem sido atribuída a estas células (MAURI & BOSMA, 2012). O conceito de que células B com funções supressoras pudessem de fato regular a resposta imune foi originado em 1974, quando se demonstrou que linfócitos B eram capazes de suprimir a resposta de hipersensibilidade tardia em cobaias (KATZ *et al*., 1974). Anos depois, Wolf e colaboradores (1996) observaram que camundongos deficientes para células B sofriam de uma forma incomum e muito mais severa de encefalomielite experimental autoimune (EAE), sugerindo que as células B pudessem ter um papel protetor neste modelo. O termo "célula B reguladora" foi aplicado e utilizado por Mizoguchi e Bhan apenas em 2006 para agrupar um crescente número de subtipos de células B que apresentavam propriedades reguladoras e que se mostravam importantes no controle de inúmeras outras síndromes autoimunes, como a artrite induzida por colágeno, colite e lúpus.

Apesar de seu papel cada vez mais evidente na regulação de respostas inflamatórias, a participação das células B na tolerância oral foi deixada de lado porque trabalhos como o de Richman e colaboradores (1978) apontavam apenas o linfócito T como necessário para a indução desse tipo de tolerância. Apenas em 2001 que Gonnella e colaboradores demonstraram que a ausência de células B influenciava o tipo de supressão que se seguia à tolerância oral. Naquele tempo a divisão entre a geração de uma resposta supressora ativa, que atualmente sabe-se contar com a participação de células T reguladoras, e de uma supressão passiva, englobando aqui a deleção, mas principalmente, a anergia dos clones antígeno-específicos, era determinada de acordo com que acontecia após a exposição do animal ou das células tolerizadas a IL-2 exógena. Ou seja, se a tolerância era revertida após a exposição a

IL-2, a tolerância era considerada passiva; caso permanecesse, era considerado o mecanismo ativo. Assim, os autores mostraram que, na ausência de células B, apenas a supressão passiva era gerada, independentemente da dose do antígeno. Já nos animais selvagens, a supressão ativa se desenvolvia após repetidas doses baixas do antígeno. Essa diferença foi correlacionada a alterações no padrão de citocinas presente nos tecidos linfoides associados ao intestino dos animais deficientes em células B, sugerindo que estas células seriam necessárias para a formação de um microambiente propício à geração de uma resposta supressora ativa.

Baseando-nos nesses dados e no fato de que as células B correspondem à população majoritária no baço dos doadores, nos perguntamos se estas células seriam as responsáveis pelo efeito protetor contra DECH. Nós demonstramos que a proteção induzida pelo tratamento do doador com a terapia combinada era perdida quando os linfócitos B eram eliminados do baço de doadores tratados antes do transplante. A perda na proteção não foi relacionada à simples ausência de linfócitos B totais, pois a reconstituição do enxerto esplênico de doadores tratados com células $CD19^{+}$ provenientes de doadores não-tratados não foi suficiente para recuperar a proteção. No entanto, quando a reconstituição das células B foi realizada com células $CD19^{+}$ provenientes de doadores tratados com a terapia, a proteção foi reestabelecida. A adição de células $CD19^{+}$ esplênicas isoladas de doadores tratados ao enxerto hematopoiético completo proveniente de animais não-tratados foi capaz de reduzir o desenvolvimento de doença enxerto contra hospedeiro nos receptores, mostrando que a terapia combinada gera uma subpopulação de células B reguladoras capaz de regular a alo-resposta.

O próximo passo foi investigar o fenótipo das células B geradas pela terapia. Estudos recentes mostraram que, dentre as células B ditas convencionais, duas subpopulações são mais frequentemente relacionadas ao perfil regulador, sendo capazes de inibir síndromes autoimunes pela produção de IL-10. A primeira, conhecida como T2-MZP (T2 – Marginal Zone Progenitor), compreende uma população de células da zona marginal, ainda imaturas (na fase T2 de diferenciação), precursoras das células B localizadas na zona marginal esplênica. Essas células são identificadas pela expressão de $CD19^{+}CD21^{+}CD1d^{+}CD23^{+}IgM^{+}$ (EVANS *et al*., 2007). A segunda população, identificada por Yanaba e colaboradores (2008) é marcada identificada como $CD19^{+}CD21^{+}CD1d^{hi}CD5^{+}$ e são maduras conhecidas células B10. Utilizando alguns desses marcadores, observamos um aumento nas células B com fenótipo de maturidade intermediário, uma vez que a frequência de células esplênicas $CD19^{+}IgM^{+}IgD^{lo}$ é maior em animais tratados quando comparados a aqueles não-tratados .

Não encontramos diferenças nas populações de células B imaturas ($CD19^{+}IgM^{hi}IgD^{-}$) ou maduras ($CD19^{+}IgM^{-}IgD^{+}$). Esses dados sugerem células do subtipo T2-MZP seriam as responsáveis pelo efeito protetor. No entanto, quando analisamos a frequência de células $CD19^{+}CD21^{+}CD1d^{hi}CD5^{-}$, onde estariam localizadas essa subpopulação, e a frequência de células $CD19^{+}CD21^{+}CD1d^{hi}CD5^{+}$, que conteriam a população de células B10, encontramos uma frequência menor de ambas as subpopulações no baço dos animais tratados quando comparados aos não-tratados.

A caracterização fenotípica das células Breg ainda é uma questão bastante contraditória. Primeiro porque as moléculas utilizadas para a sua caracterização fenotípica não são exclusivas da população reguladora. A determinação da expressão aumentada de CD1d (de modo a classificar a célula como $CD1d^{hi}$) é considerada por alguns autores como arbitrária, pois a maior ou menor expressão dessa molécula pelas células B pode variar de acordo com as condições inflamatórias, aumentando ou diminuindo de acordo com a resposta em andamento (MAURI & BOSMA, 2012). Conforme mencionado, a expressão conjunta de CD5 e $CD1d^{hi}$ identifica a subpopulação de células esplênicas B10. No entanto, CD5 também é utilizado com marcador de células B autorreativas, sendo super-regulado após a ativação do BCR (CONG *et al*., 1991). Considerando esses dados, a utilização apenas do CD1d acompanhado ou não do CD5 não discrimina as células B reg das demais populações de células B ativadas. Mesmo os marcadores das células Breg do subtipo T2-MZP não preenchem os requisitos necessários para serem adotadas como marcadores universais da população de B reguladoras. Primeiro porque essas células são fenotipicamente bastante similares à grande população de células B imaturas (MIZOGUCHI & BHAN, 2006). Segundo, não há dados na literatura que mostrem se as células Breg imaturas, ao serem transferidas, mantêm esse fenótipo ou sofrem diferenciação e amadurecem, adquirindo um outro fenótipo, compatível com seu estado de desenvolvimento e ativação (MAURI & BOSMA, 2012). A contradição fenotípica entre as B reguladoras também é encontrada quando as células humanas são analisadas. Blair e colaboradores (2010) demonstraram que células B $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$, fenótipo associados à células B imaturas, constituem a maior fração de células produtoras de IL-10, após a estimulação com CD40, encontradas no sangue periférico de indivíduos saudáveis. Já Iwata e colaboradores (2011) caracterizaram células Breg humanas com o fenótipo $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$, relacionado com células B de memória. O dado mais interessante, no entanto, foi obtido por Bouaziz e colaboradores (2010). Ao compararem a produção de IL-10 entre as populações de células B $CD27^{+}$ e $CD27^{-}$ ou entre aquelas $CD38^{+}$ e 38^{-}, a frequência de células produtoras desta citocina foi realmente maior

nos subtipos $CD27^+$ (memória) e nos subtipos $CD38^+$ (transicional). No entanto, ao se perguntarem se todas as células B produtoras de IL-10 do sangue humano se encaixavam em um ou outro subtipo, observaram que, na verdade, células B capazes de produzir IL10 estavam difusas por toda a linhagem B, apresentando fenótipos diversos e não eram, portanto, restritas ao compartimento de memória ou ao compartimento de células transicionais.

Adicionado à carência de marcadores fenotípicos específicos, não foi identificado nenhum fator transcricional associado ao desenvolvimento e/ou função das células Breg, dificultando ainda mais a sua caracterização precisa. Em vista de toda a incerteza acerca do fenótipo das células B reguladoras, Mauri e Bosma (2012) sugerem que, para serem classificadas com tal, as células B devem demonstrar capacidades supressoras *in vitro* ou *in vivo*. Ou seja, a caracterização das células Breg dever ser funcional. De fato, se nos basearmos na funcionalidade das células geradas pela terapia combinada, podemos afirmar que células B reguladoras são as responsáveis pelo efeito protetor contra a DECH.

Estudos recentes demonstraram que a expressão de determinadas moléculas, como o CD86 e o MHC de classe II são necessárias para a funcionalidade das células Breg, independente dos marcadores que expressam, ou da subpopulação em que se encaixe (MANN *et al*., 2007; SARAIVA & O'GARRA, 2010). Ao analisarmos a expressão total de CD86 e MHC de classe II nas células B, encontramos uma produção aumentada dessas moléculas nas células B esplênicas dos animais tratados com a terapia combinada quando comparado às células dos animais não-tratados. Sun e colaboradores (2012) mostraram que a incubação de células B virgens com o complexo antígeno-CTB (subunidade B da toxina colérica) induz uma geração de células B produtoras de IL-10 capaz de estimular a diferenciação e expansão de células T $Foxp3^+$ *in vitro* e *in vivo*. A aquisição deste fenótipo regulador pelas células B virgens foi acompanhada do aumento na expressão de LAP, um pepdídeo que mantem o TGFβ em sua forma latente, preso à membrana celular. Ao compararmos a expressão desta molécula nas células $CD19^+$ dos animais tratados ou não com a terapia, encontramos uma frequência maior de células B LAP^+ nos primeiros.

A importância das células LAP^+ para a proteção exercida pela terapia combinada foi confirmada quando a eliminação dessas células do baço de doadores tratados com a terapia inibiu a proteção observada. Contudo, devido a limitações técnicas, não foi possível a eliminação apenas das células B LAP^+. Como o quadro de doença enxerto contra hospedeiro foi mais grave nestes animais e cerca da metade deles desenvolveram sinais clínicos da forma crônica da doença, outras células LAP^+ possivelmente foram eliminadas. Uma possibilidade

seriam as células T reguladoras do subtipo Th3. Estas células, $TCD4^{+}CD25^{-}Foxp3^{-}$, estão presentes em compartimentos imunes periféricos e migram para o intestino quando seu ligante cognato entra pela via oral, sendo, portanto, frequentemente associadas ao processo de indução de tolerância oral. Possuem um papel fundamental na amplificação da resposta tolerogênica principalmente pela produção de TGFβ (WEINER *et al*., 2011). Em vista dessas características, sugerimos que ao depletar todas as células LAP^{+}, estamos eliminando todas as células do enxerto com potencial regulador geradas pela terapia combinada (células B LAP^{+} e células Th3). Quando eliminamos apenas os linfócitos B do baço do doador tratado, uma pequena população de células T LAP^{+} ainda seria transferida, porém seriam insuficientes para controlar a resposta alogênica no receptor.

Desde a sua descoberta, a produção de IL-10 tem sido considerada a principal característica identificadora das células Breg. Mauri e colaboradoras (2003) demonstraram que a ativação *in vitro* de células B esplênicas artritogênicas com colágeno e anti-CD40, induzia a produção de IL-10 por estas células, que passavam a ser eficazes no controle da doença quando injetadas nos animais doentes. A importância da IL-10 produzida por estas células foi demonstrada mais tarde, quando células B isoladas de esplenócitos artritogênicos e tratadas *in vitro* com anticorpos anti-IL-10 ou anti-IL-10R perdiam a capacidade de proteger os camundongos do desenvolvimento da artrite (EVANS *et al*., 2007). Nos perguntamos, então, se a IL-10 seria também importante para a proteção conferida pela terapia combinada. Considerando que a maneira mais segura de se identificar uma célula B reguladora é através da sua funcionalidade e que a detecção intracelular para IL-10 envolve a fixação e permeabilização das células, impossibilitando qualquer ensaio funcional posterior, optamos por uma abordagem alternativa: tratamos camundongos deficientes para IL-10 com a terapia combinada e transferimos apenas suas células B esplênicas juntamente com um enxerto hematopoiético de um doador não-tratado. Enquanto a transferência de $CD19^{+}$ provenientes do doador selvagem tratado com a terapia combinada foi capaz de proteger o receptor do desenvolvimento da DECH, as células $CD19^{+}$ deficientes para IL-10 não foram capazes de exercer tal proteção. Deve-se notar, entretanto, que a abordagem escolhida não permite afirmar que de fato a proteção é mediada pela produção de IL-10 pelas células B tolerizadas com a terapia. De acordo com os resultados conclui-se apenas que a proteção é dependente de células B IL-10-competentes.

Já foram descritos diversos mecanismos, diretos e indiretos, pelos quais as células Breg exercem sua função reguladora durante a resposta imune (YANG *et al*., 2013). A constatação de que camundongos deficientes para células B (μMT) possuíam uma frequência

de células Treg reduzida quando comparado aos animais selvagens (FILLATREAU *et al*., 2002) e do fato que esses animais desenvolviam doenças inflamatórias mais graves dos seus correspondentes selvagens (FILLATREAU *et al*., 2002; CARTER *et al*., 2011) indicaram que a geração de células T com funções reguladoras era um dos mecanismos pelos quais as células Breg suprimiam a inflamação. A partir daí inúmeros outros trabalhos demonstraram a importância das células Breg na geração ou manutenção de células Treg. Um exemplo foi dado pela descoberta de que a infecção por *Schistossoma mansoni* suprime a anafilaxia e a inflamação das vias aéreas em um modelo experimental de alergia por gerar células B produtoras de IL-10. Essas células Breg induzem a infiltração de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no pulmão desses animais e controlam a inflamação local (TEDDER *et al*., 2010; AMU *et al*., 2010). Especificamente no modelo de tolerância oral, Sun e cols (2008) demonstraram que a administração sublingual do antígeno complexado a subunidade B da toxina colérica induzia o aumento no número de células T $Foxp3^+$ nos animais selvagens, que não era observado, porém, em animais deficientes em células B. Os autores mostraram, ainda, que as células B isoladas dos animais selvagens tratados oralmente com o complexo antígeno-CTB produziam IL-10 e eram capazes de normalizar o número e a função de células Treg quando transferidas para animais deficientes em células B, mostrando pela primeira vez o papel de células B reguladoras no modelo de tolerância oral.

Como não observamos diferenças numéricas ou percentuais nas células $Foxp3^+$ do doador previamente ao transplante, decidimos avaliar a sua presença após este procedimento. De acordo com os dados de Beilhack e colaboradores (2005), a infiltração nos órgãos-alvo da DECH pelas células T efetoras acontece apenas a partir do 5º dia após o transplante, sendo que o 3º e 4º dias são marcados por intensa proliferação dessas células nos órgãos linfóides que drenam os sítios-alvo. Dessa forma, avaliamos a presença de células $Foxp3^+$ do doador no baço e nos linfonodos mesentéricos e periféricos dos animais receptores no 4º dia pós-transplante. De fato encontramos um aumento significativo tanto na frequência quanto no número de células $Foxp3^+$ nos sítios analisados daqueles animais reconstituídos com baço total de doador tratado com a terapia combinada. No entanto, quando as células B tolerizadas eram eliminadas do baço dos doadores tratados, previamente ao transplante, o número de células $Foxp3^+$ era menor do que o observado nos animais reconstituídos com baço total e comparativamente igual ao encontrado nos animais reconstituídos com baço de doadores não-tratados.

Avaliando os dados obtidos com essa análise e comparando com resultados anteriores parece haver alguns pontos contraditórios. O primeiro deles é que, conforme mencionado, não

há diferenças numéricas no compartimento de células $Foxp3^+$ esplênicas entre o doador tratado com a terapia e aquele não-tratado, mesmo que o primeiro tenha entrado em contato com o alo-antígeno através da imunização intraperitoneal realizada 4 dias após o fim do tratamento oral. Entretanto, quando o olhar se volta para os receptores reconstituídos com o baço dos doadores tratados e para aqueles reconstituídos com baço de doadores não-tratados, tais diferenças aparecem. Esse fato pode ser explicado por fatores inerentes ao próprio receptor como a disponibilidade de antígenos sendo apresentados de modo a favorecer a ativação das células alogeneicas, lembrando que mesmo as células tolerizadas também necessitam do antígeno e de sinais co-estimuladores para serem (re)-ativadas (WEINER *et al*., 2012); além do ambiente linfopênico encontrado nestes receptores, que favorece a expansão das células $Foxp3^+$ (ZHANG *et al*., 2005).

Adicionado a estes fatores, dados da literatura indicam que células apoptóticas são capazes de induzir ou aumentar a produção de IL-10 pelas células Breg, que, por conseguinte, aumentam a produção de IL-10 por células Treg, melhorando a sua capacidade supressora (YANG *et al*., 2013). Como neste período os receptores possuem muitas células apoptóticas, resultantes do regime de condicionamento, tais células poderiam estar amplificando a resposta tolerogênica em andamento.

Não podemos deixar de considerar, ainda, dados da literatura que indicam o papel das células Breg na indução de células $Foxp3^+$ a partir de células $Foxp3^-$. Um trabalho que exemplifica bem esta capacidade foi, o já referido, publicado por Sun e colaboradores (2012). Conforme demonstrado pelos autores, as células Breg, geradas *in vitro* pela exposição do complexo OVA-CTB, foram capazes de induzir células T $CD4^+Foxp3^+$ a partir de células T $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ após 3 dias de cocultura. O interessante é que tal conversão foi inibida pela adição de IL-2. Esse resultado está de acordo o descrito por Zheng e colaboradores (2007) que apontam a IL-2 como fator essencial para a conversão de células T $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ em células T $CD25^+Foxp3^+$ induzida por TGFβ (iTreg). Além disso, tanto as células reguladoras induzidas pelo complexo CTB-OVA (SUN *et al*., 2012) quanto as células B tolerizadas pela terapia combinada, expressam níveis mais elevados da forma latente de TGFβ (LAP-TGFβ), reforçando que é possível estar havendo a conversão de células $Foxp3^-$ em células $Foxp3^+$ nos receptores protegidos de forma dependente desta citocina. Combinado a isso, Murai e colaboradores (2009) demonstraram a IL-10 é necessária para a manutenção da expressão do fator de transcrição Foxp3 e da função supressora das células T $Foxp3^+$ em um quadro inflamatório. Esses dados sugerem que tanto o TGFβ quanto a IL-10 produzidas por células B tolerizadas pela terapia combinada poderiam estar agindo em sinergia, induzindo e

estabilizando as células iTreg Foxp3$^+$, tornando mais claro qual seria o papel das células produtoras de ambas as citocinas na proteção observada contra a DECH.

Acreditamos, assim, que as diferenças no número e frequência das células Foxp3$^+$ vista entre os dados obtidos no doador e aqueles observados no receptor após o transplante, são resultado de um conjunto de fatores que se encontram reunidos apenas no receptor, favorecendo o aumento e a amplificação da resposta tolerante, levando, portanto, a supressão da doença.

Esses mesmos fatores poderiam explicar, em parte, um segundo ponto aparentemente contraditório: se a disponibilidade de aloantígenos e o ambiente linfopênico favorecem a expansão das células CD25$^+$Foxp3$^+$ vindas do doador, como a eliminação das células CD25$^+$, prévia ao transplante, não tem qualquer efeito sobre a proteção? Conforme já mencionado, a geração de células de células Foxp3$^+$ a partir de células CD25$^-$Foxp3$^-$ por células Breg já foi demonstrada por trabalhos anteriores ao nosso e é possível que o mesmo esteja acontecendo em nossos receptores protegidos.

Adicionalmente, células Breg produtoras de IL-10 foram associadas à geração de células T reguladoras do subtipo Tr1, produtoras de IL-10 (GRAY *et al*., 2007; BLAIR *et al*., 2009; CARTER *et al*., 2011). De fato, Gray e colaboradores (2007) demonstraram que a IL-10 produzido por células B reguladoras é essencial para a indução de células T secretoras de IL-10 *in vitro*. Carter e colaboradores (2011) mostraram, ainda, que o tempo de contato entre as células T CD4$^+$ CD25$^-$ e as células B produtoras de IL-10 era significativamente maior do que o tempo de contato entre essas células T e as células B deficientes para IL-10. O contato mais demorado permitia que as células B IL-10$^+$ induzissem a conversão das células T efetoras CD4$^+$CD25$^-$Foxp3$^-$ tanto em células Foxp3$^+$ quanto em células Tr1, de maneira dependente de IL-10. De acordo com estes e outros dados disponíveis na literatura, não é impossível que as células B tolerizadas pela terapia combinada também estejam gerando células do subtipo Tr1. Essa hipótese ainda pode ser reforçada se considerarmos o aumento na produção de IL-10 nos órgãos-alvos da DECH no 25º dia após o transplante, observado apenas nos animais reconstituídos com baço de doadores tratados com a terapia. Desse modo, mesmo que as células reguladoras CD25$^+$ tenham sejam eliminadas antes do transplante, a capacidade das células Breg em gerar células T reguladoras a partir de células T CD25$^-$ pode ter suprido esta falta.

Independente se as células Foxp3$^+$ são apenas células reguladoras provenientes do doador ou a se população observada também apresenta células Treg Foxp3$^+$ geradas a partir

de células Foxp3$^-$ e ainda haja células Tr1 sendo induzidas a partir de células efetoras, o fato é que são as células B tolerizadas pela terapia combinada as responsáveis pelo aumento no número de células T reguladoras nos receptores protegidos. E, talvez, este seja o mecanismo efetor pelo qual essas células B exercem a proteção contra a DECH. Se assim o for, nossos dados estarão em acordo com trabalhos anteriores que mostram a capacidade das células T reguladoras de proteger os receptores contra a doença enxerto contra hospedeiro, sem prejudicar o efeito enxerto contra leucemia (TRENADO *et al*., 2003; EDINGER *et al*., 2003). Edinger e colaboradores (2003), por exemplo, mostraram que as células Treg CD25$^+$ inibem a proliferação das células T efetoras por suprimirem a produção de IL-2 por estas células, porém, não eliminam sua capacidade citotóxica, permitindo sua ação contra as células tumorais.

O fato de induzirem células Treg, entretanto, não impede que as células B tolerizadas pela terapia combinada exerçam outras funções supressoras e não abrangidas neste trabalho. Diversos relatos mostram que, além da secreção das citocinas anti-inflamatórias, e de todo o quadro supressor gerado pela ação das mesmas, como a regulação do balanço entre os diferentes subtipos de células T auxiliares, indução de células dendríticas tolerogênicas e células NKT (YANG *et al*., 2013), as células Breg também podem induzir a morte de células efetoras através do contato célula-célula. Em um modelo de transplante cardíaco murino (DENG *et al*., 2007), por exemplo, a tolerância ao aloenxerto foi gerada pela administração de anti-CD45RB e a mesma só foi alcançada quando células B que expressavam tal molécula estavam presentes, uma vez que camundongos µMT, reconstituídos com células B deficientes em CD45RB, rejeitavam o enxerto. Neste caso a tolerância ao enxerto também necessitava da expressão de moléculas co-estimuladoras, como B7, CD40 e ICAM-1 pelas células B, sugerindo que estas células mediavam a tolerância após o contato direto com as células T efetoras. Corroborando esta hipótese, a neutralização da IL-10 ou a reconstituição dos camundongos µMT com linfócitos B deficientes em IL-10 não afetou a tolerância ao enxerto, mostrando que, neste modelo, a interação entre a célula B e a célula-alvo é mais importante do que a produção de citocinas anti-inflamatórias.

5.3. Gerando células B reguladoras com a Terapia combinada...

Mauri e Bosma (2012) sugerem, baseadas na plasticidade e na gama de fenótipos atribuídos aos linfócitos B reguladores que, da mesma forma que os linfócitos T, em especial os subtipos Tr1 e iTreg, células B efetoras e alguns subtipos de Breg, seriam originados a partir do mesmo progenitor, o qual seria capaz de ser reprogramado de acordo com as

necessidades do ambiente inflamatório. Se realmente esta hipótese for verdadeira, os marcadores fenotípicos perderiam um pouco a importância quando comparados à demonstração funcional da atividade supressora dessas células e à descrição dos fatores importantes para sua diferenciação. Embora ainda haja muitas peças faltando para que o quebra-cabeça sobre a diferenciação das células B reguladoras se complete, alguns fatores importantes já foram descritos.

A produção de IL-10 por células apresentadoras de antígeno pode resultar do reconhecimento de moléculas produzidas por diferentes microrganismos. Já foi demonstrado, por exemplo, que a ativação do receptor do tipo Toll 2 (TLR2) por *Mycobacterium tuberculosis* (JANG *et al*., 2004) ou lipopeptídeos de *Yersinia pestis* (SING *et al*., 2002) em células dendríticas induzem a produção de IL-10 por estas células. Quantidades significativas de IL-10 também são produzidas por macrófagos e células dendríticas mielóides após a estimulação de TLR4 e TLR9 por ligantes cognatos (BOONSTRA *et al*., 2006). De modo bastante similar, a aquisição do fenótipo regulador em células B e a consequente expressão de IL-10 por estas células parece necessitar do estímulo dado pelos receptores inatos. O trabalho de Lampropoulou e colaboradores (2008) reforçou a necessidade da ativação de TLRs. Enquanto camundongos deficientes para MyD88 não eram capazes de desenvolver encefalomielite experimental autoimune, os autores demonstraram que camundongos cuja deficiência para esta molécula era restrita às células B, desenvolviam uma forma crônica da doença acompanhada pelo aumento de respostas Th1 e Th17. Um quadro bastante similar foi observado quando camundongos com células B deficientes para TLR 2 ou 4 foram utilizados. Corroborando esses dados, camundongos normais, e que, portanto, apresentam células B MyD88-suficientes, são suscetíveis a infecção por *Salmonella typhimurium*. Essa suscetibilidade é associada a células B produtoras de IL-10 capazes de suprimir a ação de neutrófilos, células NK e células T efetoras. Por outro lado, camundongos deficientes para MyD88 apenas nas células B são capazes de controlar a infecção por este parasita, diminuindo a mortalidade observada nos animais selvagens (NEVES *et al*., 2010). Entretanto, é importante ressaltar que as células B ativadas por TLRs também podem suprimir a resposta em andamento de maneira independente da IL-10. Parekh e colaboradores (2003) demonstraram que células B ativadas com LPS eram capazes de induzir a anergia de células T $CD8^+$ através de um mecanismo que envolvia contato célula-célula e a produção de TGFβ. Neste modelo, apesar das células B secretarem ambas as citocinas, IL-10 e TGFβ, após o estímulo com LPS, apenas a segunda era necessária para controlar a ativação das células T.

A necessidade do estímulo inato para a geração de um fenótipo regulador gera uma questão bastante importante: tal como a célula reguladora, a célula B efetora também é ativada pelo reconhecimento por esses receptores de seus ligantes cognatos. Assim, como as células B conseguem diferenciar um estímulo regulador de um estímulo inflamatório? Há pelo menos duas opções possíveis para explicar este fato. Primeiro, a ativação concomitante de outras moléculas durante a interação do receptor Toll com seu receptor cognato, pode favorecer um ou outro fenótipo de acordo com a combinação em questão (IWASAKI & MEDZHITOV, 2010). Segundo, pequenas variações químicas nos ligantes cognatos desses receptores parece favorecer a indução de um fenótipo tolerante ou inflamatório. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Grangettte e colaboradores (2005) em que se demonstrou que o ácido lipoteicóico produzido por *L. plantarum* induzia um fenótipo pro-inflamatório em células mononucleares do sangue periférico. No entanto, uma mutação na enzima responsável pela D-anilação do ácido lipoteicóico produzido por essas bactérias, fez com que o reconhecimento desta molécula pelo TLR2 induzisse um fenótipo anti-inflamatório na mesma população de células utilizadas anteriomente. Esses dados sugerem que os fatores que determinam a diferenciação entre os fenótipos inflamatório e supressor nas células B podem, e provavelmente são, os mesmos que regulam esta decisão nas demais APCs.

Além do estímulo via receptores do tipo Toll, outros fatores parecem ser necessários à ativação do fenótipo regulador nas células B, como a ligação entre CD40 e seu ligante CD154 (CD40L). O CD40 é uma proteína de membrana, membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF). *In vivo*, a ligação entre CD40 e seu ligante, expresso por células T, induzem a maturação de células B em células produtoras de anticorpos (BANCHEREAU *et al*., 1994; FILLATREAU *et al*., 2002). De fato, camundongos que apresentam uma deficiência de CD40 restrita a células B não apenas sofrem de um quadro mais severo de EAE, mas também apresentam um decréscimo significativo na produção de IL-10 (FILLATREAU *et al*., 2002). Em humanos a ligação entre CD40 e CD40L também é importante na geração das células Breg, pois de acordo com os dados de Tu e colaboradores (2008), o tratamento de células B do sangue com CD40L induz células $CD4^{hi}CD25^{+}Foxp3^{+}$, capazes de suprimir a proliferação de células $CD4^{+}CD25^{-}$. Recentemente, Yoshizaki e colaboradores (2012) mostraram, ainda, que combinado ao estímulo dado pela ligação CD40-CD40L, para a geração das células Bregs do subtipo B10, a sinalização via receptor de IL-21 também era necessária.

A participação da molécula co-estimuladora CD86 também parece ser necessária para a aquisição do fenótipo regulador pelas células B. A reconstituição de camundongos µMT

irradiados com células da medula óssea de animais B7-deficientes são incapazes de proteger os receptores contra a EAE induzida pela co-transferência de células T encefalitogênicas. A proteção neste modelo de EAE só foi alcançada quando células B CD86-suficientes foram utilizadas na reconstituição dos receptores (MANN *et al*., 2007). A necessidade do co-estímulo via CD86 também parece ser verdade para células Breg humanas. No mesmo trabalho em que identificaram a presença de células Breg com o fenótipo $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$, Blair e colaboradores (2010) mostraram que capacidade supressora destas células era revertida com a adição de anticorpos anti-CD86 ou anti-CD80. No modelo de tolerância oral, Gonnella e colaboradores (2005) demonstraram que, apesar de não ser necessário para a indução da tolerância, o CD86 era importante, assim como as células B, para a produção de TGFβ nos animais tolerizados. Contudo, neste trabalho os autores não mostraram que o CD86 precisa estar expresso nas células B, ou seja, eles observaram que tanto a falta de células B quanto a ausência de CD86 levava a uma diminuição na produção de TGFβ após a indução de tolerância oral.

Finalmente, apesar da falta de trabalhos que indubitavelmente comprovem sua participação, trabalhos recentes têm sugerido que a sinalização pelo BCR, receptor de células B, é necessária na indução de um fenótipo regulador por essas células. Um dos dados que apontam nessa direção, é que camundongos deficientes para CD19, co-receptor necessário para a sinalização pelo BCR, desenvolvem um quadro de EAE mais grave do que o seu correspondente selvagem (SATO *et al*., 1995; SATO *et al*., 1996). Além disso, camundongos MD4, cujos BCRs são específicos para a lisozima de ovo de galinha, possuem frequência e números menores de células B produtoras de IL-10. Esse dado sugere que, devido à ausência do antígeno cognato neste sistema, não há estímulo necessário para a geração das células B reguladoras (YANABA *et al*., 2009).

Para serem ativadas durante uma resposta imune, as células B precisam reconhecer o antígeno cognato e receber outro sinal co-estimulador. Dessa forma, Lampropoulou e colaboradores (2008) propuseram que também as células B reguladoras necessitariam de pelo menos dois sinais para adquirirem o fenótipo supressor durante uma resposta inflamatória. De acordo com os autores, o sinal dado pela ligação do TLR com seu ligante cognato iniciaria a produção de IL-10 por uma pequena parcela de células B, insuficientes para controlar a inflamação. Em um segundo momento, o reconhecimento pelos receptores classicamente envolvidos na sobrevivência e expansão das células B, tais como o BCR e o CD40, amplificaria a população inicial de células B produtoras de IL-10, de modo que esta passe a apresentar números suficientes para o controle do quadro inflamatório. Com base neste

modelo, acreditamos que o *Lactococcus lactis* dado aos animais durante o tratamento oral, estaria agindo como um adjuvante da tolerância oral, fornecendo o estímulo inato necessário para a ativação inicial das células B reguladoras. O extrato de proteínas do receptor seria o estímulo dado ao BCR, necessário para amplificar a população inicial de Bregs. Este modelo explicaria a necessidade de ambos os tratamentos, o antígeno dado via oral e o probiótico, serem administrados juntos, visto que, quando utilizados separadamente, não geram proteção.

Uma vez que o transplante é realizado, as células B tolerizadas pela terapia combinada e transferidas com o enxerto, são re-estimuladas pelo encontro com grandes concentrações do antígeno. Possivelmente, ao apresentarem antígenos do receptor às células alorreativas, haveria a consequente ligação entre as moléculas CD40 e CD40L, elevando os níveis de IL-10 produzido pelas Breg. Neste momento, a presença de células apoptóticas reforçaria ainda mais fenótipo regulador dessas células (figura 5.1).

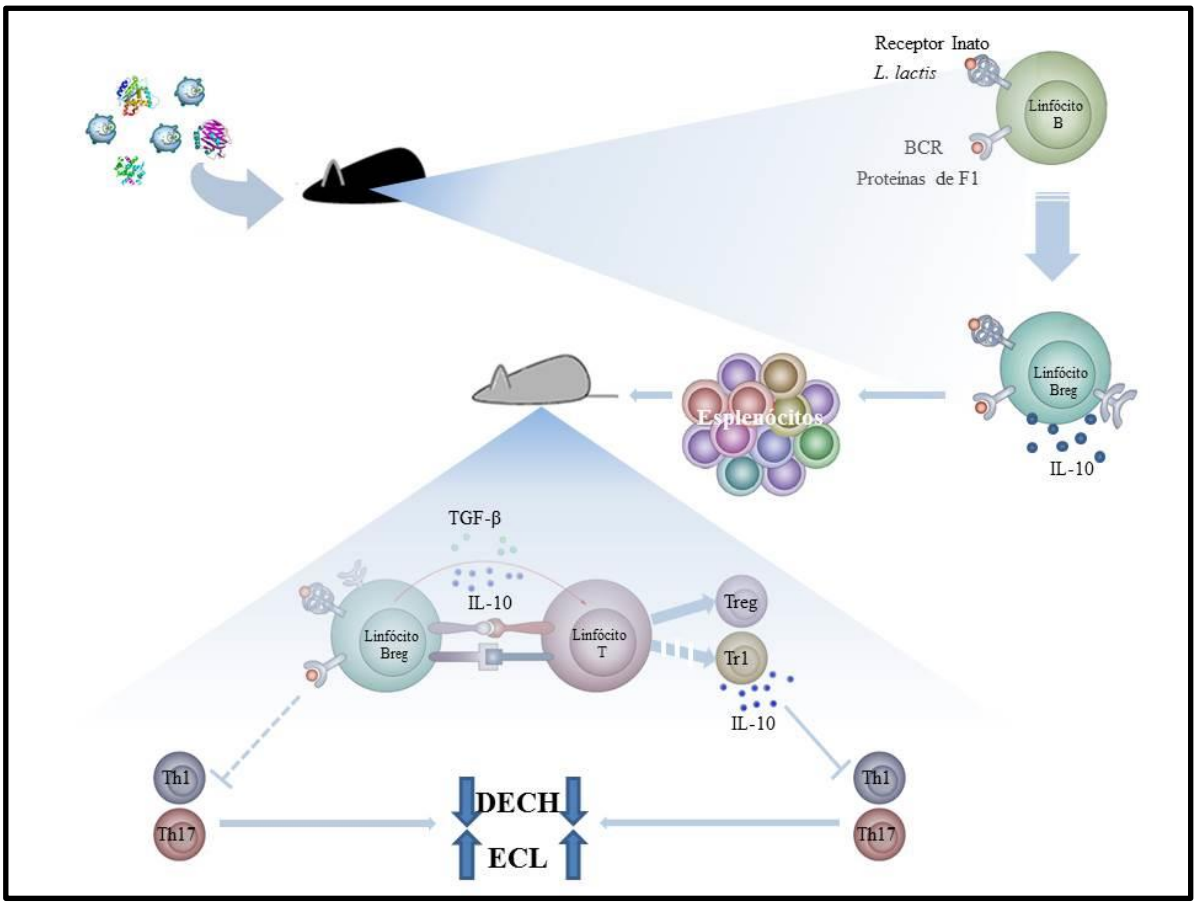

Figura 5.1: Geração da proteção contra a DECH aguda induzida pelo tratamento do doador com a terapia combinada. De acordo com os dados obtidos este trabalho propõe que o *Lactococcus lactis* age como um adjuvante da tolerância oral, fornecendo o estímulo inato necessário para a ativação inicial das células B reguladoras. O extrato de proteínas do receptor seria o estímulo dado ao BCR, necessário para amplificar a população inicial de Bregs. Uma vez no receptor, estas células B tolerizadas, IL-10-suficientes, induziriam a geração/expansão de células T reguladoras. Finalmente, as células T reguladoras alorreativas seriam capazes de inibir a resposta a antígenos do receptor, mantendo a responta contra tumor. (Por Galvani, R.).

Apesar do modelo proposto, ainda há inúmeros pontos que precisam ser respondidos. O primeiro se refere ao alo-antígeno e às células Breg. Como a tolerância gerada nos animais receptores é antígeno-específica, é provável que proteínas desses animais realmente estejam sendo reconhecidas pelo receptor das células B reguladoras. Contudo, não sabemos se estas células também são capazes de apresentar estes antígenos às células T alo-reativas. Se as células B realmente estiverem apresentando alo-antígenos, a supressão poderia ocorrer, também, por um mecanismo dependente de contato com essas células efetoras da alo-resposta. Combinado a isso, a produção de citocinas anti-inflamatórias impediria respostas do tipo Th1 e Th17, com concomitante geração de células T reguladoras, que amplificariam a alça reguladora.

Um segundo ponto é que ainda não temos dados suficientes para afirmar que a *L. lactis* utilizada por nós esteja, de fato, ativando algum TLR. Embora, por ser uma bactéria Gram-positiva, produza o ácido lipoteicóico, ligante cognato do TLR2, é possível que o *L. lactis*, assim como as demais bactérias probióticas, produza outras moléculas com capacidades imunomoduladoras. Desta forma, é necessário um estudo mais aprofundado do metaboloma desta bactéria a fim de identificar outras moléculas que possam estar agindo em nosso modelo. Além disso, ou combinado a esse fato, há alguns relatos de outros receptores "inatos" ou mesmo não relacionados diretamente com a resposta imune, na geração de células B com atividades supressoras. Um exemplo é a subunidade B da toxina colérica. De acordo com os trabalhos de Sun e colaboradores (2008 e 2012), o CTB se liga ao receptor gangliosídeo GM-1 e, independente do antígeno complexado a ele ou da especificidade do BCR da célula, o complexo é internalizado, levando à produção de IL-10 pelas células B que, inclusive, passam a ser capazes de induzir células T reguladoras.

Finalmente, nossos dados não excluem a participação de outras células na indução das células B reguladoras no doador. Dados recentes na literatura têm sugerido que células dendríticas podem influenciar a geração de células Breg. Qian e colaboradores (2012) mostraram que células dendríticas $CD11b^{hi}Ia^{low}$ estimuladas por células estromais esplênicas, são capazes de induzir a diferenciação de células B para um fenótipo único, CD19hiFcγIIb^{hi}, produtor de IL-10 e capaz de inibir a resposta por células T $CD4^{+}$. De acordo com os autores, a conversão para esse subtipo de células Breg foi dependente da produção de IFNβ e CD40L pelas células dendríticas, sugerindo a importância do contato célula-célula neste modelo. Parcina e colaboradores (2013) demonstraram que um dos mecanismos utilizados pelo *Staphylococcus aureus* para evadir a resposta imune é através da ativação de células dendríticas plasmocitóides pela proteína A que, por sua vez, aumentam a produção de IL-10

por células B. Baseado nestes dados é possível que células dendríticas tolerogênicas possam estar sendo geradas pela terapia combinada, atuando precocemente na indução das células B reguladoras. Dessa forma, por atuarem localmente, no sítio da mucosa, seriam insuficientes para transferir a tolerância quando as células esplênicas são transferidas.

Em conjunto, nossos dados demonstraram que o tratamento prévio do doador de células-tronco hematopoiéticas com a terapia que combina a indução de tolerância pelo uso de probióticos em conjunto com o extrato de proteínas alogeneica foi capaz de proteger o receptor do transplante do desenvolvimento da doença enxerto contra hospedeiro, sem que houvesse o prejuízo do efeito enxerto contra leucemia. A proteção foi alcançada pela geração de células B com funções supressoras no doador que, uma vez transferidas, foram capazes de induzir a expansão de células T reguladoras. Assim, acreditamos que o tratamento proposto representa uma estratégia promissora não apenas no tratamento da doença enxerto contra hospedeiro, mas na prevenção da rejeição de transplantes como um todo.

6. CONCLUSÕES:

Baseado nos dados apresentados, conclui-se que:

- O tratamento do doador com a terapia combinada é capaz de diminuir a severidade clínica e histopatológica da Doença Enxerto contra Hospedeiro aguda nos receptores e reduzir a mortalidade associada à doença;

- A proteção induzida pelo tratamento do doador com a terapia combinada é específica e duradoura;

- Os receptores protegidos da doença enxerto contra hospedeiro ainda são capazes de eliminar de forma eficiente a leucemia induzida, mostrando que o tratamento do doador com a terapia combinada não inibe o efeito do enxerto contra a leucemia;

- A terapia combinada não afeta a distribuição da população de leucócitos no baço dos doadores tratados;

- A proteção induzida pela terapia combinada é dependente de linfócitos B do doador tolerizados e cuja função reguladora, neste modelo, é dependente da sua capacidade de produzir de IL-10;

- A células B tolerizadas pela terapia combinada induzem, nos receptores do transplante, a ativação/expansão de células $Foxp3^{+}$ provenientes do doador.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Akpek, G., Boitnott, J.K., Lee, L.A. *et al*. Hepatitic variant of graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusion. *Blood*, v.100, p. 3903–3907, 2002.

Aleljung, P., Shen, W., Rozalska, B. *et al*. Purification of collagen-binding proteins of Lactobacillus reuteri NCIB 11951. *Curr Microbiol*, v.28, n. 4, p. 231-623,1994.

Alpan, O., Bachelder, E., Isil, E., *et al*. 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat Immunol*, v. 5, n. 6, p.615-622, 2004.

Amu, S., Saunders, S.P., Kronenberg, M., *et al*. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* v.125, p.1114–1124, 2010.

Andrade, M.C., Menezes, J.S., Cassali, G.D., Martins-Filho, O.A., Cara, D.C., Faria, A.M. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin Exp Immunol*. v.146, n.2, p.312-322, 2006.

Annacker, O., Coombes, J.L., Malmstrom, V. *et al*. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med*, v. 202, p.1051-1056, 2005.

Appelbaum, F.R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*, v. 411, p. 385-389, 2001.

Appelbaum, F.R. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu Rev Med*, v. 54, p. 491-512, 2003.

Arai, S., Lee, L.A., Vogelsang, G.B. A systematic approach to hepatic complications in hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*, v. 11, p. 215–229, 2002.

Armogida, S.A., Yannaras, N.M., Melton, A.L., Srivastava, M.D. Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy Asthma Proc*, v. 25, p. 297–304, 2004.

Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., *et al*. The CD40 antigen and its ligands. *Annu Rev Immunol*. v.12. p.881–926, 1994.

Barker, N., Bartfeld, S., Clevers, H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, v. 7, n. 6, p. 656-670, 2010.

Barnes, D.W.H., Loutit, J.E. What is the recovery factor in spleen? *Nucleonics*, v. 12, p. 68-71, 1954.

Barnes, M. J., Powrie, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity*, v31, p. 401-411, 2009.

Barnes. D.W.H., Corp, M.J., Loutit, J.F., Neal, F.E. Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow. *Br Med J*, v. 2, p. 626–627, 1956.

Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M. *et al*. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest*, v.112, p. 693-706, 2003.

Beelen, D.W., Elmaagacli, A., Müller, K.D., *et al*. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood*, v. 3, p. 3267-3275, 1999.

Bemark, M., Boysen, P., Lycke, N.Y. Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1247, p.97-116, 2012.

Berger, C., Bertz, H., Schmoor, C., *et al*. Influence of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) on hematopoietic recovery and outcome following allogeneic bone marrow transplantation (BMT) from volunteer unrelated donors. *Bone Marrow Transplantation*, v. 23, p. 983-990, 1999.

Billingham, R.E. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* v. 62, p. 21,1966.

Bjorklund, A., Aschan, J., Labopin, M., *et al*. Risk factors for fatal infectious complications developing late after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, v. 40, p. 1055-1062, 2007.

Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., *et al*. $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity*, v.32, p. 129–140, 2010.

Bland, P.W., Warren, L.G. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. *Immunology*, v. 58, p. 1-7, 1986.

Blazar, B.R., Murphy, W.J., Abedi, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*, v. 12, n. 6, p. 443–458, 2012.

Blazar, B.R., Taylor, P.A., Bluestone, J.A., Vallera, D.A. Murine γ/δ-expressing T cells affect alloengraftment via the recognition of nonclassical major histocompatibility complex class Ib antigens. *Blood*, v. 87, p. 4463-4472, 1996.

Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*, v. 4, n. 5, p. 371-380, 2004.

Bodmer, J.G., Marsh, S.G., Albert, E.D., *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens.* V. 53, p. 407-446, 1999.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., *et al*. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*, v. 31, n. 3, p. 513-525, 2009.

Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., *et al*. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF- dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol*. v.177, p.7551–7558, 2006.

Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., *et al*. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol*. v.44, n.1, p.26-46, 2009.

Borregaard, N. Neutrophils: from marrow to microbes. *Immunity*, v.33, n.5, p.657-670, 2010.

Bouaziz, J.D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., *et al*. IL-10 produced by activated human B cells regulates $CD4^+$ T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. v.40, n.10, p;2686-2691, 2010.

Brent, L. Medawar Prize Lecture: tolerance and graft-vs-host disease: two sides of the same coin. *Transplant Proc*, v. 27, p.12-24, 1995.

Brent, L. Rupert Everett Billingham. 15 October 1921 – 16 November 2002. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society (1955-2000)*, v. 51, p. 33-50, 2005.

Briskin, M., Winsor-Hines, D., Shyjan, A., *et al*. Human mucosal addressin cell adhesion molecule‐1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol.* v. 151, p. 97–110, 1997.

Broady, R., Yu, J., Chow, V., *et al*. Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells. *Blood*, v. 116, p. 5748-5751, 2010.

Brok, H. P., P. J. Heidt, *et al*. Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Immunol*, v.151, n.11, p.6451-6459, 1993.

Broxmeyer, H. E., F. O. Smith. Cord blood stem cell transplantation. *In*: E. D. Thomas, K. G. Blume, *et al* (Ed.). *Hematopoietic cell transplantation*. London: Blackwell Science, p.431-443, 1999.

Bruce, M.G., Ferguson, A. The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice. *Immunology,* v. 59, p. 295-300, 1986.

Bullen, C.L., Tearle, P.V., Willis, A.T. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in-vivo study. *J Med Microbiol,* v. 9, p. 325-33, 1976.

Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., Chadee, K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.292, n.1, p.315-322, 2007.

Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., *et al*. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol*. v.186, p.5569–5579, 2011.

Cavazzana-Calvo, M., Andre-Schmutz, I., Hacein-Bey-Abina, S., *et al*. Improving immune reconstitution while preventing graftversus-host disease in allogeneic stem cell transplantation. *Semin Hematol*, v.39, p.32–40, 2002.

Chakraverty, R., Côté, D., Buchli, J., *et al*. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med*, v.203, n.8, p.2021-2031, 2006.

Chao, N. J., S. G. Emerson, *et al.* Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 354-371, 2004.

Chen, L., Cohen, A.C., Lewis, D.B. Impaired allogeneic activation and T-helper 1 differentiation of human cord blood naive CD4 T cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, v.12, n.2, p.160-171, 2006.

Chen, X., Xu, J., Shuai, J., *et al*. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus strain* ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol*, v.115, p.307–312, 2007.

Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., *et al*. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*, v.13, p.177-180, 1995.

Cheroutre, H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol*, v.22, p.217-246, 2004.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*, v. 71, p. 1-20, 2001.

Collado, M.C., Hernandez, M., Sanz, Y. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains. *J Food Prot*. v. 68, p. 1034 –1040, 2005.

Cong, Y., Weaver, C.T., Lazenby, A., Elson, C.O. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J Immunol.* v. 169, p. 6112-6119, 2002.

Cong, Y.Z., Rabin, E., Wortis, H.H. Treatment of murine CD5− B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Int Immunol*. v.3, p.467–476, 1991.

Cooke, K. R., L. Kobzik, *et al*. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*, v.88, n.8, p.3230-3239, 1996.

Cooke, K.R., Hill, G.R., Crawford, J.M., *et al*. Tumor necrosis factor-alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. v. 102, p. 1882-1891, 1998.

Coombes, J.L., Powrie, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol*. v. 8, p. 435-446, 2008.

Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., *et al*. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-β and retinoic acid dependent mechanism. *J Exp Med.* v. 204, p. 1757-1764, 2007.

Cottler-Fox, M. Hematopoietic progenitor stem cells. *In*: R. K. Burt, H. J. Deeg , *et al* (Ed.). *On call in... bone marrow transplantation*. New York: *R.G. Landes company and Chapman & Hall*, p.69-75, 1996.

Cudkowicz, G., Bennet, M. Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. I. Graft rejection by irradiated responder mice. *J Exp Med*. v.134, p.83-102, 1971a.

Cudkowicz, G., Bennett, M. Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F 1 hybrid mice. *J Exp Med*. v.134, p.1513-1528, 1971b.

Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. Yeast as probiotics — Saccharomyces boulardii. *Aliment Pharmacol Ther.* v.26, p.767-778, 2007.

de Moreno de LeBlanc, A., Chaves, S., Carmuega, E., *et al*. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology*, v.213, n.2, p.97-108, 2008.

de Roock, S., van Elk, M., van Dijk, M.E., *et al*. Lactic acid bacteria differ in their ability to induce functional regulatory T cells in humans. *Clin Exp Allergy*. v.40, n.1, p.103-110, 2010.

de Vrese, M., Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem Eng Biotechnol.* v.11, p.1-66, 2008.

Deeg, H.J. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*, v.109, n.10, p.4119-4126, 2007.

Deng, S., Moore, D.J., Huang, X., *et al*. Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes. *J Immunol*. v.178, p.6028–6032, 2007.

Devergie, A. Graft vs. host disease. *In*: E. Apperley, E. Carreras, *et al. Hematopoietic stem cell transplantation*. Paris: Institute de Recherche sur les Leucémies et les Maladies du Sang, p.163-176, 2004.

Diaz, R.L., Hoang, L., Wang, J., *et al*. Maternal adaptive immunity influences the intestinal microflora of suckling mice. *J Nutr*. v.134, p.2359-2364, 2004.

Domen, P.L., Muckerheide, A., Michael, J.G. Cationization of protein antigens: Abrogation of oral tolerance. *J. lmmunol.* v.139, p.3195-3198, 1987.

Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., *et al*. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* v.102, p.448-455, 1995.

Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., *et al*. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol*. v.178, p.6092–6099, 2007.

Dupont, B. Immunology of hematopoietic stem cell transplantation: a brief review of its history. *Immunol Rev.* v.157, p.5-12, 1997.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., *et al*. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science,* v.308, p.1635-1638, 2005.

Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., *et al*. $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibitinggraft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. v.9, n.9, 1144-1150, 2003.

Elson, C.O., Cong, Y., McCracken, V.J., *et al*. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev.* v.206, p.260-76, 2005.

Encabo, A., Solves, P., Carbonell-Uberos, F., Miñana, M.D. The functional immaturity of dendritic cells can be relevant to increased tolerance associated with cord blood transplantation. *Transfusion*, v.47, n.2, p.272-279, 2007.

Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., *et al*. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α-defensins. *Blood*, v.120, n.1, p.223-231, 2012.

Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., *et al*. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol,* v.178, p.7868–7878, 2007.

Fagarasan, S., Honjo, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol.* v.3, p.63-72, 2003.

Farache, J., Koren, I., Milo, I., *et al*. Luminal Bacteria Recruit CD103(+) Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation. *Immunity*, v.38, n.3, p.581-595, 2013.

Faria, A.M., Weiner, H.L. Oral tolerance. *Immunol Rev*, v. 206, p. 232-259, 2005.

Feleszko, W., Jaworska, J., Rha, R.D., *et al*. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. v.37, n.4, p.498-505, 2007.

Ferrara, J. L., J. E. Levine, *et al.* Graft-versus-host disease. *Lancet*, v.373, p.1550-1561, 2009.

Ferrara, J., F. J. Guillen, *et al*. Cutaneous acute graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens in a murine model: histologic analysis and correlation to clinical disease. *J Invest Dermatol*. v.86, n.4, p.371-375, 1986.

Ferrara, J.L.M., Antin, J.H. The patophysiology of graft-versus-host disease. In: Thomas, E.D., Blume, K.G., Forman, S.J. *Hematopoietic Cell Transplantation*. London, United Kingdom: Blackwell Science, p.305-315, 1999.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., *et al*. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. v.3, p.944–950, 2002.

Foligne, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., *et al*. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One*, v.2, n.3, p.313, 2007.

Ford, C.E., Hamerton, J.L., *et al.* Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, v.177, p.452-454, 1956.

Fujii, N., Takenaka, K. *et al.* Hepatic graft-versus-host disease presenting as an acute hepatitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. v.27, p.1007-1010, 2001.

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., *et al*. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, v.469,n.7331, p.543-547, 2011.

Furuse, M., Fujimoto, K., Sato, N., *et al*. Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. *J Cell Sci.* v.109, p.429-435, 1996.

Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., Tsukita, S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* v.143, p.391-401, 1998.

Galdeano, C.M., Perdigón, G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol*. v.97, n.4, p.673-681, 2004.

Gale, R.P., Bortin, M.M., Van Bekkum, D.W., *et al*. Risk factors for acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. v.67, p.396-406, 1987.

Garside, P., Steel, M., Worthey, E.A., *et al*. Lymphocytes from orally tolerized mice display enhanced susceptibility to death by apoptosis when cultured in the absence of antigen in vitro. *Am J Pathol.* v.149, n.6, p.1971-1999, 1996.

Gautreaux, M.D., Gelder, F.B., Deitch, E.A., Berg, R.D. Adoptive transfer of T lymphocytes to T-cell-depleted mice inhibits *Escherichia coli* translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun.* v.63, p.3827-3834, 1995.

Gerbitz, A., Schultz, M., *et al*. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood,* v.103, p.4365-4367, 2004.

Glass, B., Uharek, L., Hartung, G., *et al*. Immunotherapeutic aspects of allogeneic peripheral progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* v.21, (Suppl 3):S3_/8, 1998.

Goker, H., Haznedaroglu, I.C., *et al.* Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol*. v.29, p.259-277, 2001.

Goldin, B.R., Gorbach, S.L. Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin Infect Dis.* v.46, p.96-100, 2008.

Gonnella, P.A., Waldner, H.P., Weiner, H.L. B cell-deficient (μMT) mice have alterations in the cytokine microenvironment of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) and a defect in the low dose mechanism of oral tolerance. J Immunol. v.166, p.4456–4464, 2001.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., *et al*. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity*, v.29, n.3, p.464-475, 2008.

Grabig, A., Paclik, D., Guzy, C., *et al*. Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun*. v.74, n.7, p.4075-4082, 2006.

Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., *et al*. Enhanced antiinflammatory capacity of a Lactobacillus plantarum mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.102, n.29, p.10321-1036, 2005.

Gratama, J.W., Kraan, J., *et al.* Analysis of variation in results of CD34+ hematopoietic progenitor cell enumeration in a multicenter study. *Cytometry*, v.30, p.109-117, 1997.

Gray, M., Miles, K., Salter, D., *et al*. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.104, p.14080–14085, 2007.

Greinix, H.T., Volc-Platzer, B., Kalhs, P., *et al*. Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Blood*, v.96, p.2426-2431, 2000.

Gronlund, M.M., Lehtonen, O.P., Eerola, E., Kero, P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. v.28, p.19-25, 1999.

Hajjar, A.M., Ernst, R.K., Tsai, J.H., *et al*. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol*. v.3, n.4, p.354-359, 2003.

Hakim, F., Fowler, D.H., *et al*. Animal models of acute and chronic graft-versus-host disease. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 4: Unit 4.3, 2001.

Hammerschmidt, S.I., Ahrendt, M., Bode, U., *et al*. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. J Exp Med. v.205, p.2483–2490, 2008.

Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., *et al*. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity*, v.37, n.2, p.339-350, 2012.

Hanson, D.G., Vaz, N.M., Maia, L.C., Hornbrook, M.M., Lynch, J.M., Roy, C.A. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. v.55, n.1-6, p.526-532, 1977.

Hayashi, H., Sakamoto, M., Benno, Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol.* v.46, p.535-548, 2002.

Heimesaat, M.M., Nogai, A., Bereswill, S., *et al*. MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut*, v.59, n.8, p.1079-1087, 2010.

Hershberg, R.M., Mayer, L.F. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells — polarity and complexity. *Immunol Today,* v.21, p.123-128, 2000.

Heuvelin, E., Lebreton, C., Grangette, C., *et al*. Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *Bifidobacterium breve* soluble factors. *PLoS One*, v.4, n.4, p.e5184, 2009.

Hill, A., Artis, D. Intestinal Bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu. Rev. Immunol*. v.28, p.623-667, 2010.

Hill, G.R., Crawford, J.M., Cooke, K.R., *et al*. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*, v.90, p.3204-3213, 1997.

Hings, I.M., Filipovich, A.H., Miller, W.J., *et al*. (1993). Prednisone therapy for acute graft-versus-host disease: short versus long term treatment. A prospective randomized trial. *Transplantation*, v.56, p.577–580, 1993.

Ho, V.T., Zahrieh, D., Hochberg, E., *et al*. Safety and efficacy of denileukin diftitox in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, v.104, n.4, p.1224-1226, 2004.

Holler, E., G. Rogler, *et al.* Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GVHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, v.104, p.889-894, 2004.

Holzapfel, H.W., Haberer, P., Geisen, R., *et al*. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*. v.73, p.365-373, 2001.

Horowitz, M.M. Uses and growth of hematopoietic cell transplantation. In: E. D. Thomas, K. G. Blume, *et al.* Hematopoietic cell transplantation. London: *Blackwell Science*, p.12-18, 1999.

Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, v.75, p.555–562, 1990.

Husby, S., Jensenius, J.C., Svehag, S.E. Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Quantification, estimation of size distribution, and relation of uptake to levels of specific antibodies. *Scand J Immunol*. v.22, n.1, p.83-92, 1985.

Iacomino, G., Tecce, M.F., Grimaldi, C., *et al*. Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *Biochem Biophys Res Commun*. v.285, n.5, p.1280-1289, 2001.

Ilan, Y., Margalit, M., Ohana, M., *et al*. Alleviation of chronic GVHD in mice by oral immuneregulation toward recipient pretransplant splenocytes does not jeopardize the graft versus leukemia effect. *Hum Immunol*. v.66, n.3, p.231-240, 2005.

Iliev, I.D., Mileti, E., Matteoli, G., *et al*. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning . *Mucosal Immunol.* v.2, p.340–350, 2009b.

Iliev, I.D., Spadoni, I., Mileti, E., *et al*. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut*, v.58, p.1481–1489, 2009a.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, v.139, p.485-498, 2009.

Iwasaki, A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* v.2, p.381-318, 2007.

Iwasaki, A., Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. v.327, n.5963, p.291-295, 2010.

Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., *et al*. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, v.21, p.527-538, 2004.

Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., *et al*. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, v.117, p.530–541, 2010.

Jacobsohn, D.A., Vogelsang, G.B. Novel pharmacotherapeutic approaches to prevention and treatment of GVHD. *Drugs*, v.62, p.879–889, 2002.

Jacobson, L.O. Evidence for a humoral factor (or factors) concerned in recovery from radiation injury: a review. *Cancer Res*. v.12, p.315-325, 1952.

Jang, S., Uematsu, S., Akira, S., Salgame, P. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to Mycobacterium tuberculosis is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol*. v.173, p.3392–3397, 2004.

Jenq, R.R., Ubeda, C., Taur, Y., *et al*. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* v.209, n.5, p.903-911, 2012.

Johansson-Lindbom, B., *et al.* Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med.* v.202, p.1063–1073, 2005.

Johnson-Henry, K.C., Hagen, K.E., Gordonpour, M., *et al*. Surface-layer protein extracts from Lactobacillus helveticus inhibit enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol*. v.9, p.356–367, 2007.

Kahn, E., Daum, F. Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental Anomalies of the Small and Large Intestine. In Feldman, M., Friedman, L.S., Brandt, L.J. *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology/diagnosis/management*. Philadelphia: *Saunders*, p1615-1643, 2010.

Kamble, R., Oholendt, M., Carrum, G. Rituximab responsive refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. v.12, n.11, p.1201-1202, 2006.

Karam, S.M. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front. Biosci*. v.4, p.286–298, 1999.

Katz, S.I., Parker, D., Turk, J.L. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature*, v.251, p.550–551, 1974.

Klein, J., Sato, A. The HLA system. First of two parts (review). *N Engl J Med.* v.343, p.702-709, 2000.

Knoechel, B., Lohr, J., Kahn, E., Abbas, A.K. The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. *J Immunol*. v.175, p.21–26, 2005.

Kollman, C., Howe, C.W., *et al.* Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*, v.98, p.2043-2051, 2001.

Korngold, R., Sprent, J. Murine models for graft-versus-host disease. *In*: E. D. Thomas, K. G. Blume, *et al* (Ed.). Hematopoietic cell transplantation. London: *Blackwell Science*, p.296-304, 1999.

Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., *et al*. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nature Med.* v.18, p.135–142, 2012.

Krenger, W., Ferrara, J.L.M. Graft versus host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Res.* v.15, p50–73, 1996.

Kriegel, M.A., Rathinam, C., Flavell, R.A. E3 ubiquitin ligase GRAIL controls primary T cell activation and oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.106, p.16770–16775, 2009.

Krijanovski, O.I., Hill, G.R., *et al.* Keratinocyte growth factor separates graft-versusleukemia effects from graft-versus-host disease. *Blood*, v.94, p.825-831, 1999.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., *et al*. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, v.75, p.263-274, 1993.

Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., *et al*. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int J Food Microbiol.* v.72, p.215-224, 2002.

Kunkel, E.J., Campbell, J.J., Haraldsen, G., *et al.* Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med.* v.192, p.761–768, 2000.

Labbok, M.H., Clark, D., Goldman, A.S. Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. *Nat Rev Immunol*. v.4, p.565–572, 2004.

Laffont, S., Siddiqui, K.R., Powrie, F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103^{+} dendritic cells. *Eur J Immunol*. v.40, p.1877–1883, 2010.

Laguila Visentainer, J.E., Lieber, S.R., Lopes Persoli, L.B., *et al.* Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. *Cytokine*. v.32, p.171-177, 2005.

Lai, A.C., Tran, S., Simmonds, R.S. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus. FEMS Microbiol Lett*. v.215, n.1, p133-138, 2002.

Lambert, S.E., Kinder, J.M., Then, J.E., *et al*. Erythromycin treatment hinders the induction of oral tolerance to fed ovalbumin. *Front Immunol.* v.3, p.203, 2012.

Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., *et al*. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol.* v.180, p.4763–4773, 2008.

Lan, A., Bruneau, A., *et al.* Survival and metabolic activity of selected strains of Propionibacterium freudenreichii in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. *Br J Nutr.* v.97, p.714-724, 2007.

Langford, C.A. Complications of cyclophosphamide therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. v.254, p.65-72, 1997.

Lapp, W.S., Seemayer, T.A., Price, K.S., *et al*. Macrophage priming and lipopolysaccharidtriggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med*. v.175, n.2, p. 405-413, 1992.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. Genes and molecules of *Lactobacillus* supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev.* v.72, p.728-764, 2008.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., Keersmaecher, S. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. v.8, p.171-184, 2010.

LeBouder, E., Rey-Nores, J.E., Rushmere, N.K., *et al*. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol.* v.171, p.6680–6689, 2003.

Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C., Salminen, S. Displacement of bacterial pathogens frommucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. J Med Microbiol. v.52, p.925-930, 2003.

Limmer, A., Ohl, J., Wingender, G., *et al*. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol*. v.35, n.10, p.2970-2981, 2005.

Lister, J., Gryn J.F., *et al.* Multiple unit HLA-unmatched sex-mismatched umbilical cord blood transplantation for advanced hematological malignancy. *Stem Cells Dev.* v.16, p.177-186, 2007.

Liu, T.S., Musch, M.W., Sugi, K., *et al*. Protective role of HSP72 against Clostridium difficile toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. v.284, n.4, p.1073-1082, 2003.

Livingston, M., Loach, D., Wilson, M., *et al*. Gut commensal Lactobacillus reuteri 100-23 stimulates an immunoregulatory response. *Immunol Cell Biol*. v.88, n.1, p.99-102, 2010.

Locatelli, F., Bruno, B., Zecca, M., *et al*. Cyclosporin A and short-term methotrexate versus cyclosporin A as graft versus host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia given allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling: results of a GITMO/EBMT randomized trial. *Blood*, v.96, p.1690-1697, 2000.

López, P., Gueimonde, M., Margolles, A., Suárez, A. Distinct Bifidobacterium strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food Microbiol*. v.138, n.1-2, p.157-165, 2010.

Loughran, T.P., Deeg, H.J., Dahlberg, S., *et al*. Incidence of hypertension after marrow transplantation among 112 patients randomized to either cyclosporine or methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis. *British Journal of Haematology*, v.59, p.547-553, 1985.

Ma, D., Forsythe, P., Bienenstock, J. Live *Lactobacillus rhamnosus* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun.* v.72, n.9, p.5308-5314, 2004.

Maassen, C.B., van Holten-Neelen, C., Balk, F., *et al*. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. *Vaccine*, v.18, p.2613-2623, 2000.

Macpherson, A., Khoo, U.Y., Forgacs, I., *et al*. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut,* v.38, p.365-375, 1996.

Macpherson, A.J., Harris, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Rev Immunol.* v.4, p.478-485, 2004.

Main, J.M., Prehn, R.T. Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J Nat Cancer Inst.* v.15, p.1023-1029, 1955.

Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., *et al*. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica serovar Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol*. v.157, n.3, p.241-247.

Malone, F.R., Leisenring, W.M., Storer, B.E., *et al*. Prolonged anorexia and elevated plasma cytokine levels following myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. v.40, n.8, p.765-772, 2007.

Malone, F.R., Leisenring, W.M., Storer, B.E., *et al*. Prolonged anorexia and elevated plasma cytokine levels following myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. v.40, n.8, p.765-772, 2007.

Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., *et al*. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. v.178, p.3447-3456, 2007.

Maraninchi, D., Gluckman, E. *et al.* Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet*, v.2, p.175-178, 1987.

Marsh, S.G.E., Bodmer, J.G., Albert, E.D., *et al*. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens,* v.57, p.236-283, 2000.

Martin, P.J., Schoch, G., Fisher, L., *et al*. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood*, v.76, p.1464–1472, 1990.

Martin, P.J., Schoch, G., Fisher, L., *et al*. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versushost disease: initial treatment. *Blood,* v.76, p.1464-1472, 1990.

Matte, C.C., Liu, J., Cormier, J., *et al*. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nature Med*. v.10, p.987–992, 2004.

Matthews, D.C., Appelbaum, F.R., Eary, J.F., *et al*. Phase I study of 131I-anti-CD45 antibody plus cyclophosphamide and total body irradiation for advanced acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood,* v.94, p.1237-1247, 1999.

Mauri, C., Blair, P.A. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol*. v.6, n.11, p.636-643, 2010.

Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., Londei, M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med*. v.197, p.489–501, 2003.

Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., Kasper, D.L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell,* v.122, p.107-118, 2005.

Mazmanian, S.K., Round, J.L., Kasper, D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature,* v.453, p.620-625, 2008.

Messina, C., Faraci, M., de Fazio, V., Dini, G., Calò, M.P., Calore, E.; EBMT Paediatric Working Party. Prevention and treatment of acute GvHD. *Bone Marrow Transplant*. n.41, Suppl 2:S65-70, 2008.

Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature,* v.449, p.819-826, 2007.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A.Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature,* v.388, p.394-397, 1997.

Milling, S.W., Cousins, L., MacPherson, G.G. How do DCs interact with intestinal antigens? *Trends Immunol.* v.26, p.349-352, 2005.

Miron, N., Cristea, V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin Exp Immunol*. v.167, n.3, p.405-412, 2012.

Mizoguchi, A., Bhan, A.K. A case for regulatory B cells. *J Immunol*. v.176, p.705–710, 2006.

Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Smith, R.N., *et al*. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor α-mutant mice. *J Exp Med*. v.186, p.1749–1756, 1997.

Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W.V., Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.102, p.2880–2885, 2005.

Molenaar, R., Greuter, M., van der Marel, A.P., *et al*. Lymph node stromal cells support dendritic cell-induced gut-homing of T cells. J Immunol. v.183, n.10, p. 6395-6402, 2009.

Monteiro, J.P., Benjamin, A., Costa, E.S., *et al*. A. Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood*, v.105, n.4, p.1484-1491, 2005.

Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., *et al*. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*, v.314, n.5802, p.1157-1160, 2006.

Morecki, S., Gelfand, Y., *et al*. CpG-induced myeloid CD11b+Gr-1+ cells efficiently suppress T cell-mediated immunoreactivity and graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. v.14, p.973-984, 2008.

Morgan, S.M., O'connor, P.M., Cotter, P.D., *et al*. Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lacticin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. v.49, n.7, p.2606-2611, 2005.

Mowat, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. v.3, n.4, p.331-341, 2003.

Mowat, A.M. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today*. v.8, p.93-98, 1987.

Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., *et al*. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol.* v.10, n.11, p.1178-1184, 2009.

Murphy, W.J., Blazar, B.R. New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Current Opinion in Immunology*, v.11, p.509-515, 1999.

Naderi, N., Pourfathollah, A.A., Alimoghaddam, K., Moazzeni, S.M. Cord blood dendritic cells prevent the differentiation of naïve T-helper cells towards Th1 irrespective of their subtype. *Clin Exp Med.* v.9, n.1, p.29-36, 2009.

Nagler, A., Ohana, M., *et al*. Induction of oral tolerance in bone marrow transplatation recipients suppresses graft-versus-host disease in semiallogeneic mouse model. *Bone Marrow Transplatation*. v.32, p.363-369, 2003.

Nagler, A., Pines, M., Abadi, U., *et al*. Oral tolerization ameliorates liver disorders associated with chronic graft versus host disease in mice. *Hepatology*, v.31, n.3, p.641-648, 2000.

Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., *et al*. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*, v.455, p.396-400, 2008.

Nervi, B., Link, D.C., *et al.* Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem*. v.99, p.690-705, 2006.

Neurath, M.F., Finotto, S., Fuss, I., *et al.* Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol.* v.22, n.1, p.21-26, 2001.

Neurath, M.F., Weigmann, B., Finotto, S., *et al.* The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med.* v.195, p.1129-1143, 2002.

Neves, P., Lampropoulou, V., Calderón-Gómez, E., *et al*. Signaling via theMyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity*, v.33, p.777–790, 2010.

Nevo, S., Enger, C., *et al.* Acute bleeding after allogeneic bone marrow transplantation: association with graft versus host disease and effect on survival. *Transplantation*, v.67, p.681-689, 1999.

Newburg, D.S., Walker, W.A. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res*, v.61, p2–8, 2007.

Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., *et al*. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, v.307, p.254-258, 2005.

Nishitani, Y., Tanoue, T., *et al*. *Lactococcus lactis* subsp. *Cremosis* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *International Immunopharmacology*, v.9, p.1444-1451, 2009.

Oehler, V.G., Radich, J.P., Storer, B., *et al*. Randomized trial of allogeneic related bone marrow transplantation versus peripheral blood stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. v.11, p.85-92, 2005.

Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., *et al*. Protective effect of Lactobacillus casei strain Shirota on Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 infection in infant rabbits. *Infect Immun.* v.69, n.2, p.1101-1108, 2001.

Oida, T., Zhang, X. Goto, M., *et al*. $CD4^{+}CD25^{+}$ T Cells That Express Latency-Associated Peptide on the Surface Suppress $CD4^{+}$ $CD45RB^{high}$. *J Immunol*. v.170, n.5, p.2516-2522, 2003.

Parcina, M., Miranda-Garcia, M.A., Durlanik, S., *et al*. Pathogen-triggered activation of plasmacytoid dendritic cells induces IL-10-producing B cells in response to Staphylococcus aureus. *J Immunol*. v.190, n.4, p.1591–1602, 2013.

Parekh, V.V., Prasad, D.V., Banerjee, P.P., *et al*. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol*. v.170, n.12, p.5897-5911, 2003.

Pasquini, M.C., Wang, Z. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR summary slides, 2010. Disponível em: http://www.cibmtr.org

Peng, H.J., Turner, M.W., Strobel, S. The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen. *Clin Exp Immunol*. v.81, n3, p. 510-515, 1990.

Pessione, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol*. v.2:86, 2012.

Petrof, E.O., Kojima, K., Ropeleski, M.J., *et al*. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. Gastroenterology, v.127, n.5, p.1474-1487, 2004.

Peys, E., Varghese, J., *et al*. Effects of Bacillus subtilis ‘PB6’ (ATCC — PTA 6737) on Clostridium difficile associated diarrhea (CDAD) and inflammatory bowel disease (IBD) in animal models. *Am J of Infect Dis.* v.3, p.254-265, 2007.

Powrie, F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann NY Acad Sci.* v.1029, p.132-141, 2004.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., *et al.* Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in SCID mice reconstituted with $CD45RB^{hi}CD4^{+}$T cells. *Immunity,* v.1, p.553-562, 1994.

Qian, L., Qian, C., Chen, Y., *et al*. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcγIIbhi regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood*, v.120, n.3, p.581–591, 2012.

Quesenberry, P.J., Colvin, G., *et al.* Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond. *Experimental Hematology*, v.33, p.9-19, 2005.

Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., *et al*. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*. v.126, n.2, p.520-528, 2004.

Reddy, P., Ferrara, J.L. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. B*lood Rev.* v.17, p.187-194, 2003.

Reddy, P., Teshima, T., Hildebrandt, G., *et al*. Pretreatment of donors with interleukin-18 attenuates acute graft-versus-host disease via STAT6 and preserves graft-versus-leukemia effects. *Blood*, v.101, n.7, p.2877-2885, 2003.

Renz-Polster, H., David, M.R., Buist, A.S., *et al*. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy.* v.35, p.1466-1472, 2005.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., *et al*. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* v.2, p.361-367, 2001.

Richman, L.K., Chiller, J.M., Brown, W.R., *et al*. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J Immunol*. v.121, p.2429–2434, 1978.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Larghi, P., *et al*. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood*, v.106, n.8, p.2818-2826, 2005.

Ringden, O., Remberger, M., *et al.* Peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. *Blood*, v.94, p.455-464, 1999.

Ringden, O., Remberger, M., *et al.* Faster engraftment of neutrophils and platelets with peripheral blood stem cells from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, v.25, Suppl 2, p.S6-8, 2000.

Rocha, V., Wagner, J.E.Jr., *et al.* Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*. v.342, p.1846-1854, 2000.

Round, J.L., Mazmanian, S.K. Inducible $Foxp3^{+}$ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.107, n.27, p.12204-12209, 2010.

Round, J.L., Mazmanian, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. v.9, p.313-323, 2009.

Rowe, V., Banovic, T., MacDonald, K.P., *et al*. Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, v.108, n.7, p.2485-2492, 2006.

Roy, J., McGlave, P.B., Filipovich, A.H., *et al*. Acute graft-versushost disease following unrelated donor marrow transplantation: failure of conventional therapy. *Bone Marrow Transplant*. v.10, p.77–82, 1992.

Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., *et al*. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med.* v.339, p.1565-1567, 1998.

Russo, M., Nahori, M.A., Lefort, J., *et al*. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* v.24, p. 518-526, 2001.

Ruutu, T., Niederwieser, D., Gratwohl, A., Apperley, J.F. A survey of the prophylaxis and treatment of acute GVHD in Europe: a report of the European Group for Blood and Marrow,

Transplantation (EBMT). Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. v.19, p.759–764, 1997.

Sabroe I, Steven K, Dower K B *et al*. The Role of Toll-Like Receptors in the Regulation of Neutrophil Migration, Activation, and Apoptosis. *Clin Infect Dis.* v.41, n.7, p.421-426, 2005.

Safadi, R., Alvarez, C.E., Ohta, M., *et al*. Enhanced oral tolerance in transgenic mice with hepatocyte secretion of IL-10. *J Immunol*. v.175, n.6, p.3577-3583, 2005.

Sakoda, Y., Hashimoto, D., *et al.* Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood*, v.109, p.1756-1764, 2007.

Salam, M.T., Margolis, H.G., McConnell, R., *et al*. Mode of delivery is associated with asthma and allergy occurrences in children. *Ann Epidemiol.* v.16, p.341-346, 2006.

Sandmaier, B.M., Mackinnon, S., *et al.* Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation: current perspectives. *Biol Blood Marrow Transplant.* v.13, p.87-97, 2007.

Sansonetti, P.J. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*. v.4, p.953-964, 2004.

Saraiva, M., O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. v.10, p.170-181, 2010.

Sato, S., Ono, N., Steeber, D.A., *et al*. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol*. v.157, p.4371–4378, 1996.

Sato, S., Steeber, D.A., Tedder, T.F. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.92, p.11558–11562, 1995.

Sauer, J., Richter, K.K., Pool-Zobel, B.L. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem*. v.18, n.11, p.736-745, 2007.

Saulnier, D.M., Spinler, J.K., Gibson, G.R., Versalovic, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr Opin Biotechnol*. v.20, n.2, p.135-141, 2009.

Schmaltz, C., Alpdogan, O., Horndasch, K.J., *et al*. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood*, v.97, n. 9, p.2886-2895, 2001.

Shochat, E., Rom-Kedar, V., Segel, L.A. G-CSF control of neutrophils dynamics in the blood. *Bull Math Biol*. v.69, n.7, p.2299-2338, 2007.

Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., Leiter, A.B. Minireview: development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology*, v.145, p.2639–2644, 2004.

Schultz, K.R., Paquet, J., Bader, S., HayGlass, K.T. Requirement for B cells in T cell priming to minor histocompatibility antigens and development of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. v.16, n.2, p.289-295, 1995.

Schultz, M. Clinical use of E. coli Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* v.14, p.1012–1018, 2008.

Schwarte, S., Bremer, M., *et al.* Radiation protocols determine acute graft-versus-host disease incidence after allogeneic bone marrow transplantation in murine models. *Int J Radiat Biol*. v.83, p.625-236, 2007.

Scott, C.L., Aumeunier, A.M., Mowat, A.M. Intestinal $CD103^+$ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol*. v.32, p.412–419, 2011.

Shida, K., Makino, K., Morishita, A., *et al*. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol.* v.115, p.278–287, 1998.

Shim, H.K., Kim, J.Y., Kim, M.J. , *et al*. Legionella lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages. *Exp Mol Med*. v.41, n.10, p.687-694, 2009.

Shimabukuro-Vornhagen, A., Hallek, M.J., Storb, R.F., von Bergwelt-Baildon, M.S. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*, v.114, n.24, p.4919-4927, 2009.

Shlomchik, W.D. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* v.7, n.5, p.340-352, 2007.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., *et al*. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science,* v.285, p.412–415, 1999.

Shull, M.M. *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-β1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature,* v.359, p.693-699, 1992.

Shulman, H.M., Sullivan, K.M., *et al.* Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*. v.69, p.204-217, 1980.

Siewert, C., *et al.* Induction of organ-selective $CD4^+$ regulatory T cell homing. *Eur J Immunol.* v.37, p.978–989, 2007.

Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., *et al*. Yersinia V-antigen exploits Toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med*. v.196, p.1017–1024, 2002.

Smith, K., McCoy, K.D., Macpherson, A.J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* v.19, p.59-69, 2007.

Smits, H. H. *et al.* Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol.* v.115, p.1260-1267, 2005.

Sorror, M.L., Leisenring, W., Deeg, H.J., *et al*. Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. v.11, p.814-815, 2005.

Specian, R.D., Neutra, M.R. Mechanisms of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J Cell Biol.* v.85, p.626-40, 1980.

Stern, M., Wreede, L.C., Brand, R., *et al*. Impact of graft-versus-host disease on relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, an EBMT megafile study. *American Society Hematology Annual Meeting Abstracts,* v.120, p.469, 2012.

Storb, R., Prentice, R.L., Buckner, C.D., *et al*. Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment. *N Engl J Med*. v.308, p.302-307, 1983.

Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., *et al*. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* v. 204, p.1775-1785, 2007.

Sun, J.B., Czerkinsky, C., Holmgren, J. B lymphocytes treated in vivo with antigen coupled to cholera toxin B subunit induce antigen-specific $Foxp3^{+}$ regulatory T cells and protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* v.188, p.1686-1697, 2012.

Sun, J.B., Flach, C.F., Czerkinsky, C., Holmgren, J. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J Immunol*. v.181, n.12, p.8278-8287, 2008.

Tabbara, I.A., Zimmerman, K., Morgan, C., Nahleh, Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med.* v.162, p.1558–1566, 2002.

Takahashi, H., Furukawa, T., *et al.* Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* v.26, p.1317-1323, 2000.

Takashima, S., Kadowaki, M., *et al*. The Wnt agonist R-spondin 1 regulats systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *The J of Exp Med*. v.208, p.285-294, 2011.

Tao, Y., Drabik, K.A., Waypa, T.S., *et al*. Soluble factors from Lactobacillus GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. v.290, p.1018–1030, 2006.

Tedder, T.F., Matsushit, T. Regulatory B cells that produce IL-10: a breath of fresh air in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* v.125, p.1125–1127, 2010.

Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. v.13, n.20, p.2826-2832, 2007.

Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., *et al*. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med.* v.8, n.6, p.575-581, 2002.

Thomas, E.D., H.L. Lochte, H.L., *et al.* Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* v.38, p.1709-1716, 1959.

Thomas, E.D., Storb, R. The development of the scientific foundation of hematopoietic cell transplantation based on animal and human studies. *In*: E.D. Thomas, K.G. Blume, *et al*. *Hematopoietic cell transplantation*. London: *Blackwell Science*, p.1-10, 1999.

Thomson, A.W., Knolle, P.A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*. v.10, p.753–766, 2010.

Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., *et al*. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* v.167, p.1081–1089, 2005.

Till, J.E., McCulloch, C.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* v.14, p.213-222, 1961.

Todorov, S.D., Furtado, D.N., Saad, S.M., *et al*. Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for Lactobacillus acidophilus La-14, a potential probiotic strain. *New Microbiol*. v.34, n.4, p.357-370, 2011.

Toh, Z.Q., Anzela, A., Tang, M.L., Licciardi, P.V. Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease. *Front Pharmacol*. v.3, p.171, 2012.

Treiner, E., *et al.* Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*, v.422, p.164-169, 2003.

Trenado, A., Charlotte, F., Fisson, S., *et al*. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitutionand control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *Clin Invest*. v.112, n.11, p.1688-1696, 2003.

Tsuda, M., Hosono, A., Yanagibashi, T., *et al*. Intestinal commensal bacteria promote T cell hyporesponsiveness and down-regulate the serum antibody responses induced by dietary antigen. *Immunol Lett*. v.132, p.45–52, 2010.

Tu, W., Lau, Y.L., Zheng, J., *et al*. Efficient generation of human alloantigen-specific CD41 regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood*, v.112, p.2554–2562, 2008.

Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* v.9, n.11, p.799-809, 2009.

Turner, J.R., Rill, B.K., Carlson, S.L., *et al*. Physiological regulation of epithelial junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol.* v.273, p.1378-1385, 1997.

Vallera, D.A., Blazar, B.R. T cell depletion for graft-versus-host-disease prophilaxis: a perspective on engraftment in mice and humans. *Transplantation*, v.47, p.751-760, 1989.

van Bekkum, D.W., Roodenburg, J., Heidt, P.J., van der Waaij, D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst.* v.52, p.401-404, 1974.

Van Den Brink, M.R., Moore, E., *et al*. Fas-deficient lpr mice are more susceptible to graft-versus- host disease. *J Immunol*. v.164, n.1, p.469-480, 2000.

van der Flier, L.G., Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. v.71, p.241-260, 2009.

Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., *et al*. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*, v.31, n.3, p.502-512, 2009.

Vasconcelos, Z.F., Dos Santos, B.M., *et al*. G-CSF-treated granulocytes inhibit acute graft versus- host disease. *Blood*, v.107, p.2192-2199, 2006.

Vicent, T.H., Soiffer, R.J. The history of t-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, v.98, p.3192-3104, 2001.

Vogelsang, G.B., Lee, L., *et al.* Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med.* v.54, p.29-52, 2003.

Vossen, J.M., Heidt, P.J., *et al*. Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v.9, p.14-23, 1990.

Vossen, J.M., Heidt, P.J., van den Berg, H., *et al*. Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v.9, p.14-23, 1990.

Wadolkowsky, E.A., Laux, D.C., Cohen, P.S. Colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by a human fecal *Escherichia coli* strain: role of growth in mucus. *Infect. Immun.* v.56, p.1030-1035, 1988.

Wagner, N., Löhler, J., Tedder, T.F., *et al*. L-selectin and β7 integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes. *Eur J Immunol*. v.28, p.3832–3839, 1998.

Walker, W.A., Isselbacher, K.J. Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders. *Gastroenterology*, v.67, n.3, p.531-550, 1974.

Walton, K.L., Galanko, J.A., Balfour Sartor, R., Fisher, N.C. T cell-mediated oral tolerance is intact in germ-free mice. *Clin Exp Immunol.* v.143, p.503–512, 2006.

Wang, X., Li, H., Matte-Martone, C., *et al*. Mechanisms of antigen presentation to T cells in murine graft-versus-host disease: cross- presentation and the appearance of cross-presentation. *Blood*, v.118, p.6426–6437, 2011.

Warren, E.H., Deeg, H.J. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens,* v.81, n.4, p.183-193, 2013.

Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., *et al*. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity,* v.24, p.677-688, 2006.

Weiner, H.L., Friedeman, A., *et al*. Oral tolerance: Immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol.* v.12, p.809-837, 1994.

Weisdorf, D., Haake, R., Blazar, B., *et al*. Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood*, v.75, p.1024-1030, 1990.

Welniak, L.A., Blazar, B.R., Murphy, W.J. Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Annu Rev Immunol*. v.25, p.139-170, 2007.

White, S.H., Wimley, W.C., Selsted, M.E. Structure, function and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol.* v.5, p.521-527, 1995.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.95, p.6578-6583, 1998.

WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. (2002). Disponível em: www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

Wilhelm, K., Ganesan, J., Müller, T., *et al*. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med*. v.16, n.12, p.1434-1438, 2010.

Winkler I.G., évesque J.P. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: When innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Experimental Hematology*, v.34, p.996-1009, 2006.

Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., Janeway, C.A.Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med*. v.184, p.2271–2278, 1996.

Worbs, T., Bode, U., Yan, S., *et al*. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med.* v.203, p.519-527, 2006.

Yan, F., Polk, D.B. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. v.277, p.50959–50965, 2002.

Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Haas, K.M. A regulatory Bcell subset with a unique CD1dhiCD51 phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, v.28, p.639–650, 2008.

Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Matsushita, T., *et al*. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol.* v.182, p.7459–7472, 2009.

Yang, M., Rui, K., Wang, S., Lu, L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol*. v.10, n.2, p.122-132, 2013.

Yang, R., Liu, Q., Grosfeld, J.L., Pescovitz, M.D. Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg*. v.29, n.8, p.1145-1148, 1994.

Yang, Y.J., Sheu, B.S. Probiotics-containing yogurts suppress Helicobacter pylori load and modify immune response and intestinal microbiota in the Helicobacter pylori-infected children. *Helicobacter*. v.17, n.4, p.297-304, 2012.

Yi, T., Chen, Y., Wang, L., *et al*. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood*, v.114, n.14, p.3101-3112, 2009.

Yoshizaki A., Miyagaki, T., DiLillo, D.J., e*t al*. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature,* v.491, n.7423, p.264–268, 2012.

Zhang, Y., E. Hexner, *et al.* $CD4^+$ T Cells Generated De Novo from Donor Hemopoietic Stem Cells Mediate the Evolution from Acute to Chronic Graftversus- Host Disease. *J Immunol*. v.179, p.3305-3314, 2007.

Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., *et al*. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive $CD4^+CD25^-$ cells to $CD25^+Foxp3^+$ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol*. v.178, n.4, p.2018-2027, 2007.

Zinselmeyer, B.H., Dempster, J., Gurney, A.M., *et al*. In situ characterization of CD4+ T cell behavior in mucosal and systemic lymphoid tissues during the induction of oral priming and tolerance. *J Exp Med*. v.201, n.11, p.1815-1823, 2005.

Zyrek, A.A., Cichon, C., Helms, S., *et al*. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherichia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol*. v.9, p.804–816, 2007.